



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“CARACTERIZACIÓN POBLACIONAL DEL
ANTÍGENO CD271 EN CÉLULAS DE PULPA Y
PAPILA DENTAL HUMANA CON
INMUNOFENOTIPO DE CÉLULA MADRE
MESENQUIMÁTICA”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención
en Biología Celular y Molecular**

RICARDO ALBERTO MORENO SILVA

**Director de Tesis: Dr. Sebastián San Martín
Co-Director de Tesis: Dr. Joan Villena**

Valparaíso, Diciembre de 2015



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

**“Caracterización Poblacional del Antígeno CD271 en
Células de Pulpa y Papila Dental Humana con
Inmunofenotipo de Célula Madre Mesenquimática”**

Ricardo Alberto Moreno Silva

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de los Co-Directores de Tesis Dr. Sebastián San Martín y Dr. Joan Villena en el laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Mario Párraga
Comisión Evaluación Tesis
Profesor Patrocinante

Dr. Wilfredo González
Comisión Evaluación Tesis
Profesor Informante

Dr. Claudio Aguayo
Comisión Evaluación Tesis
Profesor Informante

**Valparaíso, Chile
2015**

INDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
I. Introducción.....	6
II. Marco Teórico.....	8
1. Crestas Neurales, Pulpa y Papila Dental.....	8
2. Células Madres Mesenquimáticas.....	14
III. Hipótesis y Objetivos.....	28
IV. Materiales y Métodos.....	29
V. Resultados.....	39
VI. Discusión.....	46
VII. Conclusiones.....	50
VIII. Bibliografía.....	51
Anexo 1.....	57
Anexo 2.....	65
Anexo 3.....	67
Anexo 4.....	69
Anexo 5.....	71

ABREVIATURAS UTILIZADAS

SC: *Stem Cell*. Célula Madre

MSC: *Mesenchymal Stem Cell*. Célula Madre Mesenquimática.

MSCs: Plural de *Mesenchymal Stem Cell*.

NCSC: *Neural Crest Stem Cell*. Célula Madre de Cresta Neural.

NCSCs: Plural de *Neural Crest Stem Cell*.

SHED: *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*. Células madres de dientes deciduos humanos exfoliados.

DPSC: *Dental Pulp Stem Cell*. Célula Madre de Pulpa Dental.

NT: Neurotrofina.

NGF: *Neural Growth Factor*. Factor de Crecimiento Nervioso.

LNGFR: *Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor*. Receptor de Factor de Crecimiento Nervioso de Baja Afinidad.

TNFR: *Tumor Necrosis Factor Receptor*. Receptor de Factor de Necrosis Tumoral.

TrkA: *Tropomyosin receptor kinase A*. Receptor Tropomiosin kinasa A.

BM-MNCs: *Bone Marrow-MonoNuclear Cells*. Células Mononucleares de Médula Ósea.

bFGF: *beta-Fibroblastic Growth Factor*. Factor de Crecimiento Fibroblástico Beta.

EGF: *Epidermal Growth Factor*. Factor de Crecimiento Epidérmico.

CSC: *Cancer Stem Cells*. Células Madre Asociadas a Cáncer.

RESUMEN

En los últimos años, el aislamiento y la utilización de células madre mesenquimáticas (MSCs) multipotenciales han sido ampliamente reportados, tanto en el área de la investigación biomédica así como en la de sus aplicaciones clínicas relacionadas con la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, con foco en la capacidad de clonogenicidad en el tiempo, de diferenciación a diversos linajes celulares, de migrar a tejidos que las necesitan y de tener propiedades inmunomodulatorias.

Las MSCs fueron aisladas primero desde médula ósea y se ha reportado su obtención desde múltiples tejidos mesenquimáticos vascularizados, entre ellos la pulpa dental. Según la *International Society for Cellular Therapy*, la identificación de MSC incluye criterios inmunofenotípicos como el presentar marcación positiva para los antígenos CD73, CD90 y CD105 y negativa para los antígenos hemopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR, así como los criterios de la adherencia al plástico en el cultivo y la capacidad de diferenciación a osteoblastos, condroblastos y adipocitos.

Las células de la pulpa y papila dental provienen embriológicamente de las crestas neurales. El antígeno CD271 (p75 o LNGFR) surge como uno de los marcadores característicos de célula madre provenientes de ellas, además que se lo ha usado como marcador único para realizar el aislamiento de MSC en otros tejidos.

Por ello, nos preguntamos si las células de pulpa y papila dental de dientes definitivos que presentan un inmunofenotipo característico de MSC poseen además el antígeno CD271. Diseñamos una investigación que utilizó citometría de flujo y microscopía de fluorescencia para determinarlo en células en cultivo primario de pulpa y papila dental de terceros molares humanos.

Nuestros hallazgos concluyen que alrededor del 91% de las células de pulpa y papila dental en cultivo con inmunofenotipo de MSC, presentan además el antígeno CD271.

I INTRODUCCIÓN

El aislamiento y utilización de células madre multipotenciales ha sido un suceso en los últimos años, tanto en el área de la investigación biomédica como en la de sus aplicaciones clínicas. Más del 70% de la literatura al respecto se ha generado a partir del 2006 (Fuente: PubMed).

El interés por las capacidades de células madre mesenquimáticas (MSCs) radica en su aplicación en Ingeniería de Tejidos con el uso de andamiajes (scaffolds) naturales y/o sintéticos, así como para su aplicación en Medicina Regenerativa para diversos trastornos médicos, no sólo por su potencialidad de diferenciación, sino por su capacidad de migrar a los tejidos donde se las necesita ("Homing") (1-4) y/o por su capacidad de generar inmunomodulación (4).

Las MSCs fueron aisladas primariamente de médula ósea hemopoyética (3, 5), pero también se han obtenido de diversos tejidos conectivos como el tejido graso, las membranas sinoviales y de la dermis (5), así como de tejidos de desecho post-parto como la placenta y el cordón umbilical (5). También se las ha aislado de tejidos conectivos bucales como la encía, ligamento periodontal y la pulpa y papila dental (5-7).

Las MSCs provenientes de pulpa y papila dental son interesantes desde un punto de vista embriológico, pues provienen directamente desde las crestas neurales (8), de las cuales provienen, también, las células que darán origen al tejido óseo y conectivo de la región cráneo facial, así como de los nervios periféricos y de los melanocitos presentes en piel y mucosas, entre otros tipos celulares. De hecho, a estas células se las ha comenzado a denominar, en forma más específica, como Células Madre de Crestas Neurales (NCSCs)(8).

Las MSCs de pulpa, al igual que MSCs de otros tejidos, pueden diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipocitos (6, 9). Otros estudios han reportado también su habilidad de generar neuronas (10-12), melanocitos (7, 13) y hasta hepatocitos (14).

Las MSCs de tejido dental pueden ser obtenidas tanto de pulpas de dientes deciduos (SHED) como de dientes definitivos (DPSC), tanto de aquellos totalmente formados como de los que aún se presentan en formación. Pueden incluso, ser obtenidas

de pulpas inflamadas (15) o del tejido periodontal (16). Todo lo anterior nos revela una fuente interesante de MSCs que pueden ser obtenidas por procedimientos odontológicos de rutina, en general poco invasivos si se comparan con la obtención a partir de grasa corporal o médula ósea. Es más, actualmente los dientes extraídos o las pulpas extirpadas en procedimientos endodónticos son considerados tejidos de desecho, obteniéndose nulos beneficios adicionales al meramente odontológico.

Las MSCs pueden ser identificadas por su inmunofenotipo característico, que según los lineamientos de la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), publicados por Dominici et al. en 2006 (9), debe ser positivo para los marcadores CD73, CD90 y CD105 y negativo para los marcadores hemopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR. Otros criterios que deben cumplir las MSCs son presentar adherencia al plástico y tener capacidad de diferenciación a osteoblastos, condroblastos y adipocitos.

En la literatura estudiada, aparece el antígeno de membrana CD271 como un marcador para realizar la identificación y aislamiento de MSCs (17-23) a partir de varios tejidos mesenquimáticos pluricelulares. Se lo ha usado para aislar MSCs de médula hemopoyética (22, 24, 25), de cavidades medulares de huesos largos (26), de cordón umbilical (27, 28) y de grasa (29). Estas células mantendrían el fenotipo de MSCs y sus capacidades clásicas de diferenciación.

El CD271, conocido también como Receptor de Factor de Crecimiento Nervioso (LNGFR) o p75 Receptor de Neurotrofina (p75^{NTR}), es una proteína integral de membrana con capacidad de unirse a Neurotrofinas (NTs). Pertenece a la Superfamilia de Receptores de Factor de Necrosis Tumoral (miembro 16). Las NTs son una familia de Factores de Crecimiento polipeptídico tales como NGF, NT-3 y NT4/5 (30). Por otra parte, el CD271 o p75 es expresado abundantemente en células precursoras neuronales y es considerado, además, un típico marcador de cresta neural (12, 31) y se lo ha utilizado para aislar células madre provenientes de procesos mandibulares embriológicos (31).

Por tanto, como las células de pulpa y papila dental provienen embriológicamente de las crestas neurales y CD271 se considera un marcador de cresta neural, nos preguntamos si éste antígeno se encuentra presente en las células de pulpa y papila dental con inmunofenotipo propio de célula madre mesenquimática.

II. MARCO TEÓRICO

1. CRESTAS NEURALES, PULPA Y PAPILA DENTAL

Crestas neurales

Las crestas neurales se forman a partir de células inicialmente ectodérmicas que acompañan en la formación e invaginación del tubo neural durante las primeras semanas de la embriogénesis. Una vez que el tubo neural ha cerrado su comunicación con la cavidad amniótica y se ubica en la zona dorsal del embrión, las crestas neurales se ubican en forma latero-dorsal al propio tubo neural (Ver Fig. 1.1) (32).

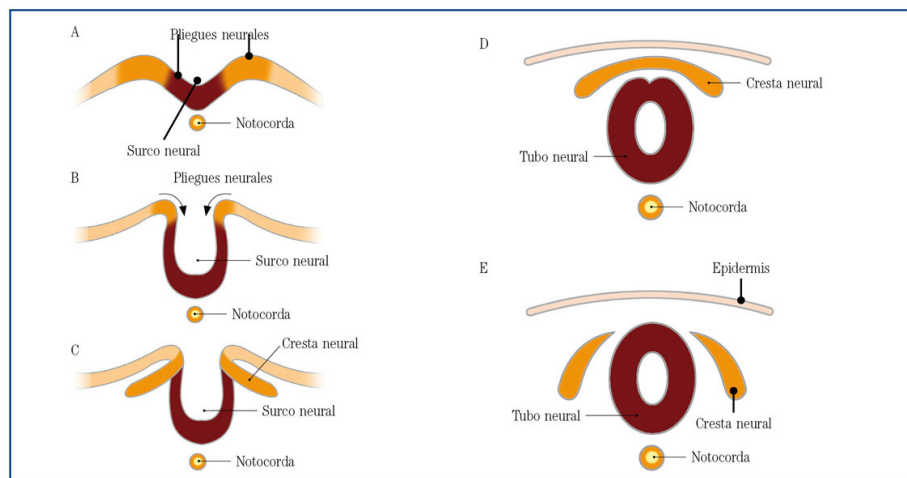


Figura 1.1. Esquema de la formación de las crestas neurales. (Tomado de Gómez de Ferraris, M. E., et al. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Buenos Aires ; Madrid, Editorial Médica Panamericana) (33).

Las células de las crestas neurales forman al menos cinco subpoblaciones que originarán diferentes tejidos: una subpoblación migrará a los epitelios estratificados de piel y mucosas y formarán a los melanocitos responsables de la pigmentación de ellos; otra población migrará y formará el tejido nervioso periférico; otra formará las células C del tiroides y la medula suprarrenal; otra dará origen al tracto de salida del corazón y una última subpoblación más abundante migrará de dorsal a ventral rellenando lo que embriológicamente se conoce como los mamelones faciales y formará la mayor parte del tejido conectivo y óseo cráneo cervical. De esta última subpoblación derivan las células conectivas que forman la pulpa dental y las células que forman la dentina, los odontoblastos, y el cemento radicular, los cementoblastos (32).

Las células de la pulpa dental, por tanto, así como de varios tejidos conectivos de la región bucal y maxilofacial provienen directamente de las crestas neurales. Por ello, tendrían la potencialidad de producir tipos celulares que provienen de éstas (32).

Pulpa dental

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo que se encuentra al interior del diente, rodeado completamente por la dentina. Este tejido está relacionado directamente con la formación del diente durante su embriogénesis y luego con su nutrición y vitalidad cuando ya se encuentra completamente formado y en plena función.

Es un tejido muy celular, altamente vascularizado y ricamente innervado, lo que explica su exquisita sensibilidad en casos de trastornos que afecten la integridad del propio diente. Está formado por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica (32).

La pulpa dental es un tejido continuo, aunque anatómicamente se lo divide en dos porciones: pulpa cameral que se ubica en la cámara pulpar en relación con la corona dentaria y pulpa radicular que se ubica en los conductos radiculares dentro de las raíces del diente (32).

Su estructura histológica es similar en ambas porciones de la pulpa así como en ambas denticiones y se distinguen claramente 4 zonas que van desde la periferia hacia el centro del diente (32) (Ver Fig. 1.2):

- a) Zona odontoblástica:** Zona muy celular donde se encuentran los odontoblastos, que son células altamente diferenciadas y especializadas tanto en la formación como en la mantención de la dentina. Presentan prolongaciones dentro de tubulillos que se encuentran en el espesor de la propia dentina. Esta zona es rica en fibras reticulares (fibras de Von Korff) que son la principal matriz extracelular de esa zona. Las terminales nerviosas libres mielínicas (de neuronas sensitivas A δ) llegan a esta zona se imbrican entre los propios odontoblastos y son las responsables de la alta sensibilidad que se manifiesta en la dentina expuesta al medio bucal (32).

- b) Zona oligocelular de Weil:** Zona con pocas células, bastante matriz extracelular amorfa y a la que llegan los capilares de vasos sanguíneos que forman verdaderas asas terminales desde la zona más central de la pulpa (32).
- c) Zona rica en células:** Como su nombre lo indica es la zona con mayor población celular de la pulpa. Abundan fibroblastos y es la zona donde se encuentran principalmente las células madre mesenquimáticas. También, se aprecian células defensivas como macrófagos tisulares y linfocitos T. Abundante vascularidad capilar y fibras nerviosas mielínicas A δ y amielínicas tipo C. Matriz extracelular es de predominio amorfo (32).
- d) Zona central de la pulpa:** Es de menor celularidad pero de mayor presencia fibrilar, sobre todo de fibra colágena tipo I. Por esta zona discurren las arteriolas y vénulas así como los troncos nerviosos más gruesos (32).

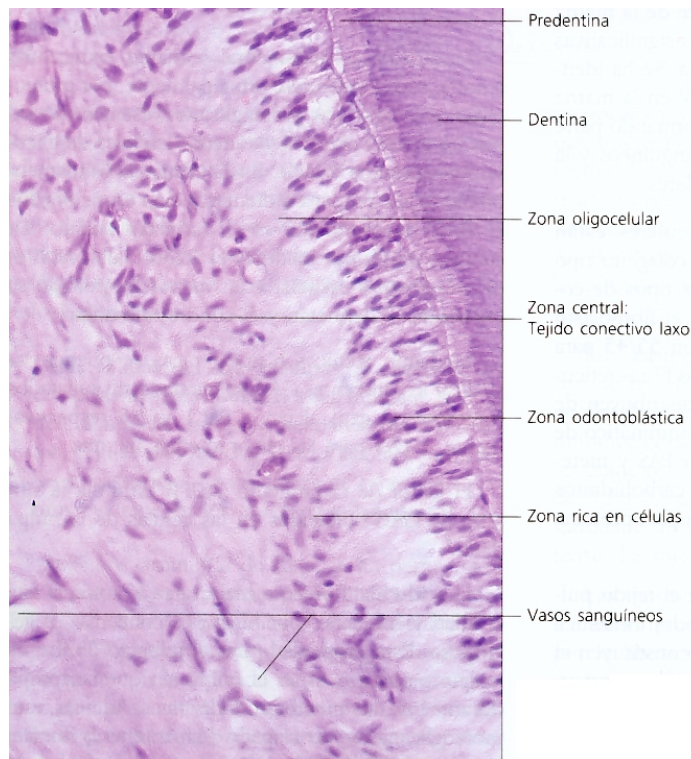


Figura 1.2. Corte histológico con tinción H-E que muestra las diferentes zonas de la pulpa (Tomado de Gómez de Ferraris, M. E., et al. (2004). *Histología, embriología bucodental*. Buenos Aires ; Madrid, Editorial Médica Panamericana) (32).

Papila dental

Corresponde al estado embrionario de la pulpa dental. Se forma en la etapa de copa o casquete de la odontogénesis y es la condensación de células ectomesenquimáticas derivadas de las crestas neurales que queda atrapada por las células epiteliales del órgano del esmalte (Ver Fig. 1.3).

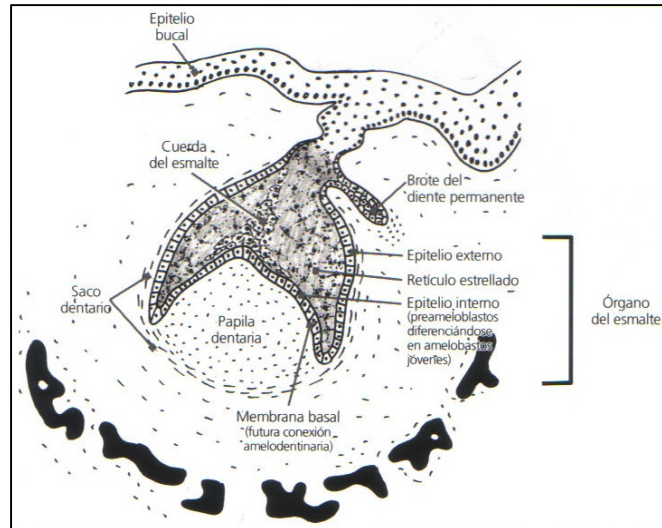


Figura 1.3. Dibujo esquemático en el que se aprecia la etapa de copa o casquete y la condensación celular que corresponde a la papila dentaria (Tomado de Gómez de Ferraris, M. E., et al. (2004). *Histología, embriología bucodental*. Buenos Aires ; Madrid, Editorial Médica Panamericana) ([32](#)).

El tejido de la papila dental es altamente celular (Ver Fig. 1.4) con una matriz extracelular muy laxa, con predominio de ácido hialurónico y proteoglicanos, con muy poca matriz fibrilar. Las células más externas de la papila quedan en contacto cercano con las células epiteliales del órgano del esmalte y son inducidas a biotransformarse en odontoblastos, los que comienzan a secretar la matriz de predentina que luego se calcifica para formar la dentina. A medida que la papila dental va quedando dentro del "estuche" rígido que supone la dentina se va transformando en pulpa dental, modificando su configuración tisular a lo descrito más arriba. Al empezar la erupción del diente con la formación de las raíces, la papila dentaria va quedando confinada a la zona más apical del diente (Ver Fig. 1.5) hasta que el diente completa su erupción y entra en contacto con los dientes antagonistas. Cuando esto último ocurre, los ápices dentarios, que aún poseían

papila dental, se cierran y la papila residual pasa a ser la zona de conexión de la pulpa dental con el periodonto apical.

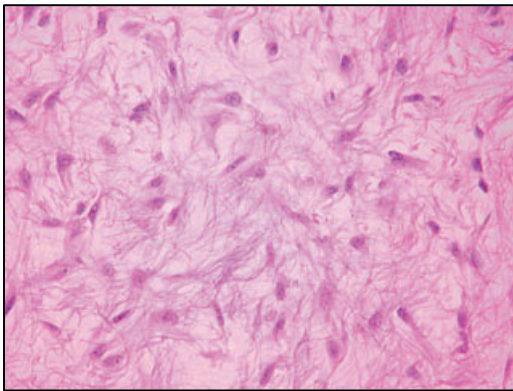


Figura 1.4. Se puede apreciar la gran celularidad de aspecto fibroblástico que posee la papila dental.

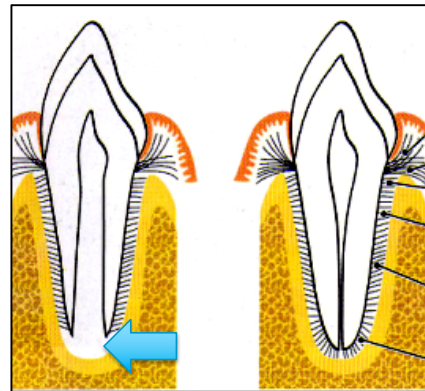


Figura 1.5. Esquema que muestra la zona donde persiste papila dental hasta la formación del ápice dentario.

Dientes deciduos versus dientes permanentes

En los estadios más jóvenes de la pulpa dental, la matriz extracelular es más laxa y bastante más celular. A medida que envejece, las cámaras y conductos radiculares se hacen más estrechos, la matriz es más fibrilar y la vascularidad y la celularidad se reducen.

Aunque los dientes temporales o deciduos sólo se encuentran en la niñez, y los procesos embriológicos suelen asociarse con las edades más tempranas, en rigor estricto, son dientes “viejos”, que están al final de su ciclo vital, sufriendo fenómenos regresivos y de resorción radicular con gran presencia de dentinoclastos, pues pronto serán exfoliados.

Por el contrario, los terceros molares de la dentición definitiva, también llamados cordales o muelas del juicio, en personas jóvenes son dientes de reciente formación o incluso no la han terminado. Son dientes que están saliendo de su etapa embriológica, por ello no es de extrañar que su pulpas (o papila, que se encuentra en la zona de formación radicular) presenten una zona rica en células mayor, con mayor matriz extracelular laxa que la de otros dientes ya formados e integrados en la función de la masticación.

Los dientes primero forman sus coronas y permanecen "inactivos" por años hasta que se inicia la fase eruptiva que implica la formación radicular. Esto se produce por etapas, que claramente son tres en la dentición definitiva ([32](#)):

- 1ª etapa: Erupción de primeros molares definitivos, dientes centrales y laterales (6-7 años de edad).
- 2ª etapa: Erupción de caninos, premolares y termina con los segundos molares definitivos (8-12 años).
- 3ª etapa: Terceros molares (18-25 años). Como se aprecia, el rango de erupción de los cordales es el más amplio.

Los terceros molares son los dientes que presentan la mayor tasa de agenesia y su tejido embrionario se lo asocia con algunos quistes y tumores como el quiste dentígero, el tumor odontogénico queratoquístico y el ameloblastoma ([34](#)).

A los terceros molares, también, se les vincula frecuentemente con morbilidad inflamatoria y de maloclusión asociada a la falta de espacio para ellos. Es por ello que frecuentemente se indica su extracción antes o durante su fase eruptiva. De su extracción no se obtienen beneficios adicionales al odontológico y pasan a ser, entonces, un material biológico de desecho.

Por lo anterior y por el creciente interés de contar con fuentes de MSCs para su uso en ingeniería de tejidos y en otras aplicaciones médicas presentes y futuras, en los últimos años han aparecido bancos de dientes que buscan el realizar la criopreservación de sus pulpas en Nitrógeno Líquido para su uso posterior, cuando existan técnicas seguras y validadas científicamente.

2. CÉLULAS MADRES MESENQUIMÁTICAS.

Las **células madres mesenquimáticas** (MSCs), también conocidas como células madre estromales, son células multipotenciales primitivas, con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capas germinales embrionarias, que persisten en los tejidos conectivos maduros y que poseen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares (5, 9). Fueron identificadas en un principio en la médula ósea hemopoyética e inicialmente conocidas como células estromales tipo-fibroblástico (3) o como unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-Fs) (5). En la mencionada médula, estas células residen en las anastomosis trabeculares óseas y secretan algunos tipos de citoquinas y factores de crecimiento que favorecen la proliferación y diferenciación de las células madre hemopoyéticas (Friedenstein et al., 1970) (3). Debido a sus capacidades de diferenciación multipotencial y efectos paracrinós, las MSCs son candidatas ideales para su uso en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (5).

Aunque la médula ósea hemopoyética es la fuente más ampliamente reconocida de MSCs, investigaciones de los últimos años han identificado fuentes tisulares alternativas de células con características de MSC, incluyendo el tejido adiposo, placenta, pulpa dental, membrana sinovial, sangre periférica, ligamento periodontal, endometrio, cordón umbilical y la sangre del mismo cordón umbilical. De hecho, la evidencia sugiere que las MSCs parecen estar presentes en virtualmente cualquier tejido conectivo vascularizado del cuerpo humano (5).

Células madres mesenquimáticas en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa

La Ingeniería de Tejidos evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios ("Scaffolds"), células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es recopilar ideas, teorías y técnicas que restauren, mantengan o mejoren los tejidos u órganos en forma completa. La piel y los cartílagos artificiales son ejemplos de tejidos fabricados por ingeniería de tejidos que han sido aprobados por la FDA; sin embargo, actualmente tienen un uso limitado en pacientes humanos (Fuente: www.nibib.nih.gov/).

La Medicina Regenerativa es un campo más amplio que incluye la Ingeniería de Tejidos, pero también incorpora investigación sobre los mecanismos inherentes asociados a la autocuración, tratando de emplear los propios sistemas del organismo, en ocasiones con ayuda de biomateriales, para obtener nuevas células funcionales con el fin de reconstruir tejidos y órganos. Los términos "ingeniería de tejidos" y "medicina regenerativa" han llegado a ser intercambiables, ya que el campo intenta enfocarse en las soluciones finales de tejidos u órganos funcionales sanos en lugar de hacerlo en los tratamientos para enfermedades complejas y a menudo crónicas (Fuente: www.nibib.nih.gov/).

Existen al menos cuatro propiedades de las MSCs que las hacen atractivas como candidatas para su uso en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa: su clonogenicidad (5), su multipotencialidad de diferenciación (9), su capacidad de migrar en forma selectiva ("homing") (1-4) y su capacidad de inmunomodulación (4).

a) Clonogenicidad

Clonogenicidad podría definirse como la capacidad que tienen ciertas células de dividirse simétricamente y generar dos células idénticas a la original, es decir, generar clones de si misma (5). Ello permite lo que se denomina la expansión clonal, donde de una cantidad relativamente pequeña de células se pueden obtener grandes cantidades de ellas, todas con las mismas capacidades biológicas y de diferenciación que las originales, sin mostrar signos de envejecimiento, de apoptosis o de diferenciación espontánea (35).

Esto es fundamental para la Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, pues permite obtener grandes cantidades de células que interesa utilizar a partir de cantidades reducidas que son las que efectivamente se pueden rescatar de los tejidos dadores.

La clonogenicidad es una de las propiedades notables de las MSCs y es fundamental que se mantenga en el tiempo y en condiciones normales de cultivo. Es deseable también, que esta propiedad se mantenga en la mayor cantidad de pasos sucesivos de cultivo, incluso pasando por periodos de animación suspendida criogénica.

b) Multipotencialidad de Diferenciación

Es otra de las características importantes que deben presentar las células madre para categorizarse como tal y para poder ser utilizadas en la Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos. Al cultivar estas células en medios especiales de diferenciación, las células comienzan a presentar progresivamente diferenciación a varias estirpes celulares. Básicamente las MSCs deben poder diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipocitos (9, 36).

Existen también, numerosos reportes de otras diferenciaciones a partir de MSCs de diverso origen. En el caso de las células madre de origen pulpar se ha reportado también diferenciación a odontoblastos (13), a neuronas (36), a músculo estriado (13) y a melanocitos (7, 13), todas ellas diferenciaciones propias de células embrionarias "ectomesenquimáticas" que provienen de las crestas neurales (13, 31). Otras diferenciaciones reportadas de las MSCs incluyen células epiteliales, neuroglia y hepatocitos (37).

c) Capacidad de migrar en forma selectiva ("Homing")

"Homing" es el proceso por el cual las MSCs migran y se incorporan en los tejidos donde pueden ejercer efectos locales y funcionales típicos (4). Se conoce inicialmente como la propiedad que tienen los linfocitos T de recircular una y otra vez por el sistema linfático, reconociéndolo como su "hogar". Aunque también se presenta en la capacidad que tienen los leucocitos de migrar en forma selectiva a los sitios de inflamación, extravasándose al intersticio extracelular donde ocurre dicha inflamación, lo que es un fenómeno bien conocido y muy estudiado (4).

La capacidad de "homing" se conoce hace mucho tiempo. Se ha usado para el trasplante de médula ósea, donde se inyecta vía endovenosa las células de la médula del donante en un paciente al cual la suya ha sido destruida. Las células trasplantadas migran naturalmente hacia los lugares donde se encuentra habitualmente la médula ósea y una vez en su lugar, proliferan y empiezan a hacer su trabajo de generar los elementos figurados de la sangre.

Son bastantes los reportes de trabajos que informan de esta propiedad desde el punto de vista terapéutico ([38](#), [39](#)), pero es más probable que ella se presente donde hay sitios de injuria reciente (fractura, cirugía, infarto al miocardio, etc.) ([2](#), [38](#), [40](#)).

d) Capacidad de inmunomodulación

La capacidad de las MSCs de modular al sistema inmune fue reconocido desde un principio después que se observó que ellas pueden evadir la inmunovigilancia después del trasplante celular ([4](#)). Esta habilidad se está empleando en ensayos clínicos con el uso de MSCs en pacientes con enfermedad de injerto contra huésped refractarios al tratamiento con corticoesteroides ([4](#)).

Las MSCs pueden suprimir la actividad de linfocitos T y Natural Killers. Tendrían también la capacidad de inducir células T reguladoras y modular la actividad de células dendríticas ([3](#)), aunque todavía no están muy claros los mecanismos de cómo ocurren estos fenómenos. Por ello se han propuesto como agentes inmunoterapéuticos en una variedad de trastornos autoinmunes que incluyen Diabetes Mellitus tipo I, Enfermedad de Crohn, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y otras ([3](#)). Esta capacidad de modular al sistema inmune y no estimularlo permitiría el uso de células madre de fuentes alogénicas.

Identificación y aislamiento de células madres mesenquimáticas

En 2006, Dominici et al. ([9](#)) publicaron en la revista *Cytotherapy* los criterios mínimos para definir lo que son las células estromales mesenquimáticas multipotentes, indicando a su vez la postura de la *International Society for Cellular Therapy* respecto de éste tema. Inicialmente proponen el término de "Células Estromales Mesenquimáticas Multipotentes" en vez del de "Células Madre Mesenquimáticas" que es la denominación que más se usa. La abreviación en inglés MSC que se usa para la segunda (mesenchymal stem cells) podría usarse para la primera (multipotent mesenchymal stromal cells).

Respecto de los criterios mínimos mencionados ([9](#)), estos son:

- a) En condiciones estándares de cultivo, las MSCs deben presentar adherencia al plástico de los frascos o placas de cultivo.

- b) Cerca del 95% o más de la población de MSC debe expresar los marcadores CD105, CD90 y CD73 medido en Citometría de Flujo. Adicionalmente, deberán carecer de expresión (<2% de positividad) de marcadores hematológicos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR.
- c) Las células deben poder diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos en medios estándares de diferenciación.

La adherencia al plástico es una de las propiedades bien descritas de las MSCs que mantienen en el tiempo y se presenta bajo condiciones de cultivo tradicional. Esta propiedad por si sola en ocasiones se considera como una forma de seleccionar MSCs (5, 9).

Para la identificación inmunofenotípica de MSCs, Dominici et al. (9) proponen los antígenos de superficie CD105 (conocido como Endoglina y originalmente por MAb SH2), CD73 (conocido como ecto-5'-nucleotidasa y originalmente por MAb SH3 y SH4) y CD90 (también conocido como Thy-1). Indican, también, que nuevos marcadores de superficie identificados en un futuro pueden llevar a modificaciones de este panel de marcadores positivos básicos. En el mismo criterio inmunofenotípico y para asegurar que poblaciones de MSCs de diversos orígenes no sean confundidas por otras células, recomiendan que carezcan de expresión de marcadores antigénicos de células hematopoyéticas como los expuestos más arriba (9). Además, otros marcadores que generalmente son expresados por las MSCs incluyen a CD13, CD29, CD44 y CD10 (5).

Finalmente, la propiedad biológica que más identifica a las MSCs es su capacidad de diferenciación a tres linajes mesenquimáticos característicos: osteoblástico, adipocítico y condroblástico. Debe ocurrir en condiciones de cultivo estándares que favorezcan dichas diferenciaciones (9).

Sin embargo, sólo una fracción de las células que se adhieren al plástico cumplen con todos los criterios de MSC, y sus características finales se relacionan más al medio de donde provienen *in vivo*. Por ejemplo, la proporción de MSCs de la médula ósea que presentan potencialidad osteogénica es mayor que las que presentan potencialidad adipogénica (41, 42). Existe incluso una población más inmadura de MSCs, que serían más parecidas a Células Madre Embrionarias que expresan OCT-4 y SOX-2 (5).

Marcadores inmunofenotípicos de MSCs

Los marcadores propuestos para MSCs se podrían dividir en dos categorías: marcadores únicos y en panel fenotípico. Un marcador único es una alternativa interesante a la adherencia al plástico como método de selección de MSC, el cual sería suficiente como para identificarlas o incluso purificarlas desde su ambiente *in vivo* (5). La selección de Dominici et al. (9) correspondería al segundo tipo de marcadores.

Alrededor de 16 moléculas han sido sugeridas como marcadores únicos de MSCs, sin embargo son cuatro las que han recibido mayor atención y sobre las cuales se han hecho la mayoría de los estudios respecto de su expresión en los diferentes tejidos: Stro-1, SSEA-4, CD146 y CD271 (5).

a) Stro-1

La molécula Stro-1 es uno de los marcadores de MSCs mejor conocidos. Es una proteína integral de membrana de un solo paso que se trasloca desde el retículo endoplásmico en respuesta a la depleción del calcio intracelular (5).

Células Stro-1 (+) cuando son inyectadas en forma endovenosa exhiben una gran capacidad de migración (homing) al bazo, médula ósea y riñón (43). En medio condicionado para MSCs Stro-1(+), ellas puede inducir un mayor grado de reparación cardiovascular que las MSCs que sólo se seleccionan por su adherencia al plástico (44). Se sugiere que Stro-1 estaría involucrado en la clonogenicidad y jugar un importante rol en la migración a sitios específicos (homing) y propiedades angiogénicas de MSCs (5).

Stro-1 no se expresa en todas las fuentes de MSCs conocidas. Si lo hace en las provenientes de médula ósea (95%), pulpa dental, membrana sinovial, ligamento periodontal, dermis, endometrio y decidua parietal. Su expresión es negativa o muy baja en MSCs de tejido adiposo, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical y derivadas de sangre periférica. Por ello no está claro si la expresión de Stro-1 se correlaciona con multipotencialidad (5).

b) SSEA-4

SSEA-4 es un marcador de célula madre embrionaria. Está bien documentado que permite aislar eficientemente MSCs de la médula ósea. De hecho, las MSCs SSEA-4(+) provenientes de médula ósea expanden en cultivo muy bien, en cambio las SSEA-4(-) fallan en su crecimiento. La expresión de SSEA-4 gradualmente se incrementa en el tiempo en cultivos de médula ósea. Las MSCs SSEA-4(+) muestran la tri-potencialidad característica (5).

Adicional a las MSCs de médula ósea, la expresión de SSEA-4 es positiva en células madre provenientes de placenta, ligamento periodontal, pulpa dental y membrana sinovial. Por el contrario, las provenientes de tejido adiposo, cordón umbilical y derivadas de sangre del cordón umbilical no expresan esta molécula (5).

Aún así, la clonogenicidad y multipotencialidad de las células SSEA-4(+) muestra ser superior a la selección de MSCs por adherencia al plástico o por otras moléculas (5).

c) CD146

CD146 es una proteína clave en la adhesión celular endotelial vascular y en la angiogénesis. Emerge como un atractivo candidato para identificar genuinas MSCs, pues las que selecciona presentan una mayor multipotencialidad. CD146 identifica MSCs con mayor capacidad de soportar la hematopoyesis (5). *In vitro*, las MSCs CD146(+) muestran incrementada más de 100 veces la capacidad de formar colonias en cultivo a largo plazo comparadas con las MSCs de médula ósea no seleccionadas (45). *In vivo*, células estromales perivasculares CD146(+) de médula ósea, cuando son trasplantadas a ratones, exhiben la capacidad de reorganizar el microambiente hematopoyético en sitios heterotópicos (5, 46).

La expresión de CD146 se encuentra en prácticamente todas las fuentes de MSCs. Se incluyen, además de médula ósea, las de tejido adiposo, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical, membrana sinovial, placenta, dermis, pulpa dental, ligamento periodontal y discos intervertebrales. Las MSCs CD146(+) de todos estos orígenes exhiben potencialidad de diferenciación en los tres linajes clásicos (5).

d) CD271

El antígeno CD271, conocido también como Receptor de Factor de Crecimiento Nervioso de Baja Afinidad (LNGFR) o p75 Receptor de Neurotrofina (p75^{NTR}), es una proteína integral de membrana con capacidad de unirse a Neurotrofinas (NTs) (30). Pertenece a la Superfamilia de Receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNFR)/FAS (miembro 16). Las NTs son una familia de Factores de Crecimiento Polipeptídico tales como NGF, NT-3 y NT-4/5 (30), las cuales estimulan a las células neuronales a sobrevivir y diferenciarse (5). Por otra parte, el CD271 o p75 es expresado abundantemente en células precursoras neuronales y es considerado, además, un típico marcador de cresta neural y se lo ha utilizado para aislar células madre provenientes de procesos mandibulares embriológicos (31). De hecho, a estas células se las denomina como Células Madre de Crestas Neurales (NCSCs) (8).

El receptor de neurotrofina p75 o CD271 se codifica en un gen de 3,4kb con 5 exones en el cromosoma 17q21-q22. La proteína posee 427 aminoácidos, que tiene un dominio extracelular que cuenta con cuatro repeticiones de 40 aminoácidos con 6 residuos de cisteína en posiciones conservadas seguido por una región rica en serina/treonina, un dominio simple transmembrana y un dominio citoplasmático de 155 aminoácidos que no exhibe actividad catalítica. La región rica en cisteína contiene el dominio de unión al factor de crecimiento nervioso. CD271/p75 puede actuar como receptor de NT independiente o formando un complejo receptor con Sortilin o un co-receptor de TrkA, y está involucrado en regular señales de muerte, diferenciación o supervivencia (Ver Fig. 2.1) (Fuente: NCBI Reference Sequence: NP_002498.1).

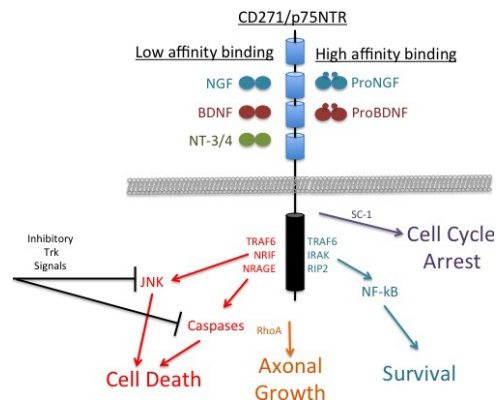


Figura 2.1. Dibujo esquemático de receptor CD271 que muestra sus principales ligandos y acciones río abajo. Tomado de Neuroblastoma, Prof. Hiroyuki Shimada (Ed.), ISBN: 978-953-51-1128-3, InTech, DOI: 10.5772/55536.(47).

CD271 se ha usado para seleccionar unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-Fs) a partir de células mononucleares de médula ósea (BM-MNCs). El porcentaje de células BM-MNCs que son CD90(+)CD105(+)CD45(-) CD34(-)CD79(-) coincide con la cantidad de ellas que son CD271(+) ([22](#)). Adicionalmente, las células CD271(+) de médula ósea son principalmente condrogénicas ([48](#)).

Son varios los reportes de selección de MSCs con expresión de CD271 en médula ósea ([22](#), [25](#), [48-50](#)), membrana sinovial ([5](#)), tejido graso ([29](#)) y cavidades medulares de huesos largos ([26](#), [51](#)).

Sin embargo, también existen trabajos que señalan baja co-expresión de CD90 y CD73 en células CD271(+) provenientes de la médula ósea (<10%) y en tejido adiposo (10 a 20%) ([5](#)). También se reporta que entre un 50% y 99% de las células CD271(+) de médula ósea y membrana sinovial co-expresan CD34, uno de los marcadores que debiesen ser negativos según los criterios de Dominici, lo cual de por sí descalificaría al antígeno CD271 como un buen marcador único de MSC en esos tejidos ([5](#)). Además, presenta bajos niveles de expresión en MSCs derivadas de placenta y no se expresa en forma importante en cordón umbilical ni sangre de cordón umbilical ([28](#)).

- **CD271, crestas neurales, pulpa y papila dental**

Como ya ha quedado establecido, no sólo existen marcadores fuertemente asociados a las MSCs como CD73, CD90 y CD105 ([5](#), [52](#)), sino que hay otros tantos que se asocian a crestas neurales y entre ellos están CD271 (p75 o LANGFR) ([31](#), [53](#), [54](#)), Snail ([8](#)), Slug ([8](#)), SNAI1([53](#)), NTRK3([53](#)), SOX9([53](#)), MSX1([53](#)), nestin([54](#)), SOX10([54](#)).

Hay referencias directas de la presencia de CD271 en procesos faciales embrionarios, cuando las crestas neurales se encuentran en proliferación y migrando hacia ventral. Como lo expuesto por Wen et al. ([31](#)) que analizaron cortes histológicos de procesos faciales embriológicos de ratas Sprague-Dawley que estaban en los 11,5 días de desarrollo (E11.5). Con inmunofluorescencia encontraron positividad de expresión para CD271, STRO-1, CD29, CD44, CD90 y CD105. Adicionalmente, separaron y cultivaron las células CD271+ y se las puso en medios adipogénicos, osteogénicos, condrogénicos y neurogénicos, donde presentaron las diferenciaciones correspondientes.

Otros autores en cambio, señalan la expresión en papila y/o pulpa dental de marcadores propios de crestas neurales, entre ellos CD271. Abe et al. (8) realizaron cultivos primarios a partir de pulpa apical (papila dental) y pulpa coronaria de terceros molares que no han completado formación en medios que inducen formación de neuroesferas, siendo mayores las que se forman a partir de las células provenientes de la zona apical. Las que derivan de la zona apical expresan marcadores asociados a cresta neural (p75, Snail y Slug) y las de la zona coronaria a células madre neurales (Nestin y Musashi 1). Señalan luego que las células de las esferas derivadas de la zona apical se diferencian a linaje mesenquimático (osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células de músculo liso) y nervioso (neuronas), y sugieren que estas células están más cercanas al origen embriológico de crestas neurales, lo cual es consistente en lo analizado más arriba en este marco teórico.

Martens et al. (55) reportaron detección con inmunohistoquímica de CD271 (NGFRp75) en la zona de células sub-odontoblástica de dientes definitivos. Ello se condice con la zona de la pulpa que es rica en células.

Otros informes relacionados con la expresión en pulpa dental de marcadores asociados a crestas neurales lo hace Al-Zer et al. (54), que cultivaron células pulpares de molares cordales en placas cubiertas por fibronectina y medio neurobasal enriquecido con B27, bFGF, EGF, insulina, L-glutamina y neuregulina-beta1. La población enriquecida expresó nestina, CD271 y SOX-10 y fueron exitosamente inducidas a diferenciarse a algunas células que derivan de las crestas neurales: osteoblastos, melanocitos y células de Schwann.

- **CD271 y subpoblaciones pulpares**

Hay autores que reportan subpoblaciones de células madre pulpares en relación con la expresión de CD271. Pisciotta et al. (35) reportaron la detección con inmunofluorescencia de CD271 en células pulpares de dientes definitivos en células CD34(+) y la no detección de CD271 en las CD34(-). Señalando que ambas poblaciones muestran las diferenciaciones clásicas, pero las CD271(+)CD34(+) presentan, además, la tendencia a diferenciación neurogénica. Aunque también reportaron menor proliferación, pérdida gradual de capacidades de célula madre y temprana senescencia y apoptosis de las CD34(+) en relación a las CD34(-).

Algo similar a lo anterior reportaron Mikami et al. (30), que encontraron que células CD271(+) provenientes de pulpas de dientes deciduos carecen de la capacidad de diferenciarse a osteoblastos y adipocitos, a diferencia de lo que ocurre con células CD271(-). Ante lo cual realizaron una experiencia donde forzaron a MSCs de la cepa C3H10T1/2 con conocida capacidad de diferenciarse a las tres líneas clásicas, a sobre-expresar el antígeno CD271 lo que hace que estas células pierdan esa capacidad. Por ello concluyeron que el rol del receptor de neurotrofina (p75 o CD271) sería el de inhibir la diferenciación clásica de MSCs.

Estos reportes son algo contradictorios con otros que señalan clonogenicidad y capacidad de diferenciación de las células CD271(+). Entre ellos Waddington et al. (56) que aislaron 2 subpoblaciones de células madre a partir de incisivos de ratas Wistar de 28 días. Una expresaba altos niveles de integrina $\beta 1$ y la otra expresaba LANGFR (CD271). Ambas subpoblaciones se expandieron en cultivos de rutina y expresaron Stro-1 y Vimentina. Las LANGFR(+) expresaron también CD105 y Notch-2. Aún así, señalan que ambas subpoblaciones demostraron capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.

Lo que parece no presentar contradicciones, es lo que se señala respecto de la capacidad de diferenciación hacia una estirpe nerviosa asociada a este receptor de neurotrofina, que como se vio anteriormente, sus ligandos se relacionan con supervivencia y la diferenciación neuronal. Así lo señalan Dai et al. (57), indicando que la importancia de las células positivas a p75 (CD271) de origen pulpar, respecto de otras subpoblaciones del mismo tejido, es su capacidad de diferenciación a neuronas y de generar reparación del sistema neural.

- **CD271 y efectos de la criopreservación**

En un interesante estudio, Ducret et al. (58) criopreservaron células pulpares positivas para CD271 por 510 días. Después de descongelar, las células rescatadas fueron el doble de estables que otras células pulpares CD271 de cultivo primario fresco y no mostraron anomalías cromosómicas. Además, se mantuvo la clonogenicidad y las capacidades de expresión de genes relacionados a la mineralización fueron incrementadas en los cultivos post-descongelación con respecto de los cultivos primarios.

- **CD271 y aplicaciones terapéuticas**

Las aplicaciones en Medicina Regenerativa que se han encontrado en la literatura asociadas a la expresión de CD271 dicen relación principalmente con reparación ósea, entre ellas:

- Yasui et al. ([59](#)) aislaron células de pulpa humana que expresaban CD271(+) y CD90(+) y logró clonogenicidad notable, con proliferación exhibida a largo plazo y potencial de diferenciación multilínea *in vitro*. Promoviendo, además, la formación de nuevo hueso en defectos óseos importantes de la calota *in vivo*.
- Dreger et al. ([38](#)) reportaron la acumulación significativa de MSCs CD271(+) de médula ósea humana por al menos 7 días en el sitio de fractura de fémur en ratones inmunodeficientes, después de una inyección endovenosa con estas células, demostrando su capacidad de "homing". El periodo de ventana de esta propiedad fue de alrededor de 24h desde el momento de la fractura.
- Nampo et al. ([40](#)) crearon defectos alveolares en mandíbula de rata Wistar y los rellenaron con material dental, material de injerto de hueso iliaco y de la propia mandíbula. Con PCR se reveló que la expresión de p75 (CD271), P0, nestina y Musashi-1 fue significativamente mayor en el material dental. A las 8 semanas con tomografía computada encontraron similar formación ósea, lo que implica que material dental podría usarse como alternativa al injerto óseo de cresta iliaca, que implica alta morbilidad en su obtención.

- **Expresión de CD271 en tejidos epiteliales**

Xiao y Tsutsui ([60](#)) realizaron una experiencia donde co-cultivaron en forma tridimensional células de epitelio oral y células madres de pulpa dental por 2-7 semanas, donde lograron evidenciar invaginación epitelial, tal como lo que ocurre en las etapas tempranas de la odontogénesis. Se revisó la expresión de varias moléculas, entre ellas p75 (CD271) y se encontró expresión en el tejido epitelial en la etapa de inicio de la invaginación pero no después, lo que sugeriría que el receptor de neurotrofinas juega un papel en la señalización de la interacción epitelio-mesenquimática durante la invaginación del propio epitelio oral en las primeras etapas de la odontogénesis.

- **CD271 y cáncer**

En la literatura estudiada aparecen varias referencias respecto de CD271 y cáncer, entre ellas:

- Redmer et al. ([61](#)) reportaron que el receptor de neurotrofina (p75 o CD271) se comportaría como un regulador de varios genes asociados a melanoma y sería un determinante crucial de las propiedades similares a células madre que presentan los melanomas, tales como la capacidad de formación de colonias y la tumorigenicidad.
- Tian et al. ([62](#)) reportaron la expresión de subpoblaciones CD271(+) y CD271(-) en biopsias de osteosarcoma. Encontraron que las células de osteosarcoma CD271(+) mostraron más características de lo que se ha denominado células madre cancerosas (CSC), favoreciendo la auto-renovación celular, la diferenciación, la resistencia a drogas y la tumorigenicidad *in vivo*. Lo anterior se podría relacionar con las variedades osteoblástica, condroblástica y fibroblástica que poseen los osteosarcomas.
- Murillo-Sauca et al. ([63](#)) señalaron que las células iniciadoras de tumor en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello han sido caracterizadas por la expresión de CD44(+), sin embargo no es funcionalmente activo. Encontraron, además, expresión de CD271(+) restringido sólo a las CD44(+). Se demostró que las células CD44(+)CD271(+) son las que presentan mayor tumorigenicidad y se comprobó que el receptor CD271 está funcionalmente activo en estas células. La pérdida de función de CD271 resulta en un bloqueo del ciclo celular en fase G2-M, generando un profundo impacto en la capacidad de iniciar la formación de tumor *in vivo*. Al incubar las células de cáncer escamoso con anticuerpos anti-CD271, decrece la fosforilación de Erk y decrece la formación del tumor *in vivo*.

Según lo presentado en esta revisión, la pulpa y la papila dental provienen embriológicamente de las crestas neurales y poseen en su composición una población de células madres mesenquimáticas. Por otra parte, el receptor de neurotrofina CD271 se ha usado como marcador de MSC en otros tejidos y se considera característico de células derivadas de las crestas neurales. Por lo expuesto, aún no está dilucidado que las células de pulpa y papila dental que presentan el inmunofenotipo de célula madre mesenquimática presenten a su vez el antígeno CD271. Es por ello que proponemos la hipótesis que se presenta a continuación:

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS:

Células de pulpa y papila dental de terceros molares en cultivo con inmunofenotipo de célula madre mesenquimática* presentan marcación positiva para antígeno CD271.

2. OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la expresión del antígeno CD271 en células de pulpa y papila dental de tercer molar humano en cultivo con inmunofenotipo de Célula Madre Mesenquimática*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células con inmunofenotipo de MSC* de la población celular en cultivo.

2.- Determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células con marcación positiva de CD271 de la población celular en cultivo.

3.- Determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células pulpares CD271(+) respecto de las CD105(+)/CD90(+)/CD45(-).

4.- Establecer mediante inmunofluorescencia directa la co-expresión y distribución de la marcación de CD90(+), CD105(+) y CD271(+) en las células en cultivo.

5.- Establecer mediante inmunofluorescencia directa la co-expresión y distribución de la marcación de CD73(+), CD105(+) y CD271(+) en las células en cultivo.

6.- Verificar mediante inmunofluorescencia directa de las células en cultivo la ausencia de marcación para CD45.

* Como inmunofenotipo de MSC se considerará que las células sean CD105(+), CD90(+) y CD45(-).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO:

Este es un estudio de laboratorio de carácter descriptivo, en el cual se realizó observación de la expresión de inmunomarcación del antígeno CD271 en células de pulpa y papila dental humana en cultivo con inmunofenotipo de Célula Madre Mesenquimática.

2. ENTORNO:

El presente estudio se realizó en dependencias de las Facultades de Odontología y de Medicina de la Universidad de Valparaíso:

- La obtención de los órganos dentarios, de los que se extraería la pulpa y papila dental para este trabajo, se realizó en el pabellón de cirugía menor de la Escuela de Odontología (Autorizado por Decano de la Facultad de Odontología y Director de Servicios Clínicos).
- Los demás procedimientos y las mediciones finales se efectuaron en laboratorios del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina (Edificio Bruno Günther) (Autorizado por Director del Centro de Investigaciones Biomédicas).

3. UNIVERSO:

- Son todas las células de las pulpas y papilas dentales de 6 terceros molares donados por 2 pacientes varones sanos de 21 años y que firmaron un consentimiento informado de donación de órganos dentarios para la investigación el cual fue aprobado por Comité de Bioética de la Escuela de Odontología (Ver Anexo 1).
- Los donantes debían tener sus terceros molares sanos, en evolución eruptiva o incluídos o semi-incluídos o erupcionados, con indicación terapéutica de exodoncia.

4. MUESTRA:

- El muestreo inicial fue por conveniencia, debido a que las células provienen de pulpas y papilas dentales de 6 terceros molares donados.

- La muestra de estudio fueron las células que efectivamente pudieron proliferar en diversos pasos de cultivo celular primario. En definitiva, las células del estudio provienen de un único molar.

4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LA MUESTRA

- Células de pulpas dentales vitales obtenidas de terceros molares sanos con indicación terapéutica de exodoncia, donados por pacientes varones sanos entre 18 y 25 años inclusive, y que hayan firmado un consentimiento informado de donación de órganos para investigación aprobado por Comité de Bioética de la Escuela de Odontología (Ver Anexo 1).

4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LA MUESTRA

- Células de pulpas vitales de terceros molares con patología inflamatoria perioperatoria.
- Células de pulpas vitales de terceros molares de pacientes fuera de dicho rango etario.
- Células de pulpas vitales de terceros molares de pacientes dentro de rango pero con patología sistémica.
- Células de pulpas vitales de otros dientes.
- Células de pulpas desvitalizadas de terceros molares.

5. SUJETOS O UNIDADES DE ESTUDIO:

- Células en cultivo primario provenientes de tejido pulpar y papilar dental humano de tercer molar.

5.1 CRITERIO DE INCLUSIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO:

- Células del cultivo adherentes al plástico.

5.2 CRITERIO DE EXCLUSIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO:

- Células del cultivo no adherentes al plástico.

6. DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES:

Variable	Definición	Tipo de Variable	Medición
Células con Inmunofenotipo de MSC	Porcentaje del Total de Células de la muestra que presentan marcación positiva para CD90/CD73 y CD105 y marcación negativa para CD45 (9)	Cuantitativa Continua	Porcentual
Células CD271+	Porcentaje del total de células de la muestra que presentan marcación positiva de CD271	Cuantitativa Continua	Porcentual
Células con inmunofenotipo de MSC con marcación positiva de CD271	Porcentaje del total de células de la muestra con fenotipo de MSC que presentan marcación positiva de CD271	Cuantitativa Continua	Porcentual
Expresión de CD271 en células CD105/CD90(+) y CD45(-)	Presentación de marcación para CD271, en las células CD105/CD90 positivas y CD45 negativas	Cualitativa Dicotómica	Si/No
Expresión de CD271 en células CD105/CD73(+) y CD45(-)	Presentación de marcación para CD271, en las células CD105/CD73 positivas y CD45 negativas	Cualitativa Dicotómica	Si/No

7. INSUMOS DE INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

7.1 Anticuerpos para Inmunofluorescencia Directa:

En la experiencia fueron usados los siguientes anticuerpos conjugados para ser utilizados tanto en citometría de flujo como en microscopía de fluorescencia:

- Anticuerpos (IgG1) monoclonales de ratón Anti-CD271 humano conjugados con FITC (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).
- Anticuerpos (IgG1) monoclonales de ratón Anti-CD90 humano conjugados con PE (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).
- Anticuerpos (IgG1) monoclonales de ratón Anti-CD73 humano conjugados con PE (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).
- Anticuerpos (IgG1) monoclonales de ratón Anti-CD105 humano conjugados con APC (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).
- Anticuerpos (IgG1) monoclonales de ratón Anti-CD45 humano conjugados con PerCP (Abcam plc, Cambridge, UK).

7.2 Paneles de Inmunotipificación:

Los anticuerpos se organizaron en 2 paneles de inmunotipificación. En cada panel se utilizaron 2 Acs positivos y uno negativo para identificación inmunofenotípica de MSCs más el Ac de estudio anti-CD271.

Panel A:

Incluye los Acs Anti-CD105(APC) y Anti-CD90(PE) que marcan positivos para MSCs (9), Anti-CD45(PerCP) que no debe presentar marca para MSCs (9) más Anti-CD271(FITC).

Panel B:

Incluye los Acs Anti-CD105(APC) y Anti-CD73(PE) que marcan positivos para MSCs (9), Anti-CD45(PerCP) que no debe presentar marca para MSCs (9) más Anti-CD271(FITC).

Para citometría de flujo se utilizó sólo el panel A, debido a que la presentación de CD73 era prácticamente idéntica a CD90 y el citómetro sólo podía captar en 4 canales. Para la microscopía de fluorescencia se emplearon los paneles A y B.

8. INSTRUMENTOS

8.1 Citometría de Flujo:

- Citómetro de Flujo BD[®] FACSCalibur[®] (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU).

8.2 Microscopía de Fluorescencia:

- Microscopio de Fluorescencia de cuerpo invertido motorizado Olympus[®] modelo IX81 (Olimpus Corporation, Tokio, Japón).

9. METODOLOGÍA:

El estudio se realizó en tres etapas bien definidas, que son:

9.1 ETAPA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

- Se extrajeron 6 terceros molares, provenientes de 2 voluntarios (3 molares de cada uno) que cumplieron con los criterios de inclusión. Los terceros molares se encontraban en fase eruptiva y no poseían espacio en las arcadas dentarias, por lo que su indicación terapéutica era la de extracción.
- Las exodoncias se realizaron, a cada donante por separado, en Pabellón de Cirugía Menor de la Escuela de Odontología por Cirujano Oral y Maxilofacial docente de dicha Cátedra, bajo procedimientos de rutina.
- Los molares se sujetaron por la corona con fórceps para evitar su excesiva manipulación y evitar lesionar la zona apical (papila dental).
- En el mismo pabellón se lavaron de restos de sangre con suero fisiológico estéril y se les realizó mediante uso de turbina y fresas estériles un surco profundo sin llegar a cámara pulpar por debajo de límite amelo-cementario con el fin de facilitar el seccionamiento corono-radicular posterior en el Laboratorio de Biología.
- Se volvieron a lavar en suero fisiológico estéril. Luego se les dio un baño por 1 min en digluconato de clorhexidina al 0,12%, se enjuagaron en suero fisiológico estéril y se colocaron en recipiente que contenía líquido de transporte (medio de cultivo celular).

- En lapso menor a 2 horas, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina (Edificio Bruno Günther).
- Bajo campana de flujo laminar, las muestras se retiraron del líquido de transporte y se manipularon en bandeja metálica con instrumentos estériles.
- Se sujetaron los molares por la corona con fórceps y mediante un elevador quirúrgico se procedió a realizar la fractura que separó la corona de las raíces.
- Al retirar la corona, el tejido pulpar quedó adherido a las raíces. Mediante sondas endodónticas lisas se separó la pulpa del lecho radicular y se obtuvo el tejido pulpar en casi su totalidad. Adicionalmente, se procedió a recuperar el tejido blando proveniente de la papila apical.
- El tejido retirado se colocó en criotubo de 2ml con 1ml de medio de congelación que contiene 70% de DMEM high glucose/HAM'S/F-12 (Hyclone[®], USA) más 20% de suero bovino fetal (SBF) (Hyclone[®], USA) más 10% de DMSO (Sigma).
- Se rotularon y se procedió con el protocolo de criopreservación en Nitrógeno Líquido en el Laboratorio de Criogenia del mismo Centro de Investigaciones Biomédicas, donde se almacenaron hasta su uso en la etapa de amplificación celular.
- El mismo procedimiento se realizó con todas las muestras.

9.2 ETAPA DE AMPLIFICACIÓN CELULAR MEDIANTE CULTIVO

- Se retiró del Nitrógeno Líquido 1 criotubo con el tejido pulpar/papilar de 1 molar. Se dejó descongelar a temperatura ambiente.
- Se retiró el tejido pulpar/papilar del medio de congelación y se le dieron 3 lavados con PBS 1X (Hyclone[®], USA) durante 5 min cada uno.
- El tejido pulpar/papilar se cortó en pequeños trozos y se colocó en líquido de digestión consistente en PBS más colagenasa al 3% (peso/volumen). Se incubó por 3 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.
- Se frenó la acción de la colagenasa agregando PBS más Suero Bovino Fetal (SBF) al 20% (Hyclone, USA), en relación 1:1.
- Se centrifugó a 1.500rpm x 5min.
- Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en medio de cultivo, cuya formulación contiene DMEM high glucose/HAM'S/F-12 (Hyclone[®], USA),

suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivo (SBF) (Hyclone[®], USA), 100 UI/ml de penicilina G (Hyclone[®], USA) y 100 µg/ml de Estreptomocina/Anfotericina B (Hyclone[®], USA).

- Las células se cultivaron en placa de 6 pocillos y en cada pocillo se llenó con medio de cultivo hasta completar 1,5ml.
- Se incubó en estufa a 37°C y CO₂ al 5%.
- Se cambió medio cada 2 - 3 días, realizando previamente un lavado con PBS por 5min para retirar células no adherentes o muertas.
- Al verificar una cobertura del 80% del espacio de la placa, se eliminó medio de cultivo y se realizó lavado con PBS por 5min. Se eliminó PBS y se realizó incubación con tripsina/EDTA 0,25% (Hyclone[®], USA) por 10min en estufa a 37°C y CO₂ al 5%.
- Se frenó reacción con volumen 4 veces mayor de medio de cultivo. Se centrifugó a 1.500rpm x 5min y se re-suspendió el pellet con nuevo medio de cultivo.
- Se realizó conteo celular mediante uso de Azul de Tripán y cámara de Neubauer y las células se volvieron a sembrar en 4 placas de 100mm para amplificar la expansión.
- Las células siguieron en cultivo con cambio de medio cada 2 o 3 días hasta obtener una cobertura de placa de un 80%.
- Obtenida dicha cobertura de placa, se eliminó medio y se realizó lavado con PBS por 5min. Se eliminó PBS y se realizó incubación con tripsina/EDTA 0,25% por 10min en estufa a 37°C y CO₂ al 5%.
- Se frenó reacción con volumen 4 veces mayor de medio de cultivo.
- Se centrifugó a 1.500rpm x 5min y se re-suspendió el pellet con medio de congelación consistente en 70% de DMEM high glucose/HAM'S/F-12 (Hyclone[®], USA) más 20% de suero bovino fetal (SBF) (Hyclone[®], USA) más 10% de DMSO (Sigma-Aldrich[®], USA).
- Las células fueron colectadas, contadas y se distribuyeron en 4 criotubos (10⁶ células aprox. c/u). Se congelaron a -80°C para su uso posterior en la etapa de estudio.

9.3 ETAPA DE ESTUDIO

9.3.1 Citometría de Flujo

- De un criotubo con aproximadamente 10^6 células congeladas a -80°C , se realizó nueva amplificación celular mediante cultivo para obtener alrededor de 3×10^6 células, con el fin de realizar las pruebas de Citometría.
- Las aproximadamente 3×10^6 células se dividieron en tres fracciones: dos se incubaron con el Panel A de Inmunotipificación y la tercera fracción no se incubó con anticuerpos y se utilizó como control negativo (Ver procedimiento en detalle en Anexo 2).
- Se realizó la citometría de las muestras con Citómetro de Flujo BD[®] FACSCalibur[®], usando el control negativo para calibrar el instrumento.
- El procedimiento descrito se repitió en tres ocasiones diferentes con nuevos cultivos a partir de células congeladas a -80°C .
- Se utilizaron células blancas de sangre periférica separadas por centrifugación para hacer el control positivo del Ac Anti-CD45(PerCP) (Ver procedimiento en detalle en Anexo 3).

9.3.2 Microscopía de Fluorescencia Directa. Células Aisladas.

- De una de las fracciones de células que se descongelaron, se realizó cultivo en placa de 100mm a la que se les agregó al menos 10 discos de cubreobjetos con el fin de que las células crecieran y se adhirieran sobre ellos.
- Cuando las células presentaron una confluencia de un 60% se retiraron los discos y se fijaron en paraformaldehído al 4% por 10 min.
- Se seleccionaron 8 discos para el proceso de microscopía. Se incubaron 3 discos con Panel A de inmunotipificación, 3 discos con el Panel B de inmunotipificación y se dejaron dos sin anticuerpos como controles negativos (Ver procedimiento en Anexo 4).
- Los discos con las células incubadas con ambos paneles y los controles negativos se montaron en láminas portaobjetos con medios acuosos y se rotularon para facilitar la identificación.
- Se realizó la calibración del Microscopio de Fluorescencia de cuerpo invertido motorizado Olympus[®] modelo IX81 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) con las

muestra negativas para filtrar la fluorescencia natural de las células. Se realizó recorrido visual de las muestras del Panel A y el Panel B y se eligieron los sectores donde se realizó la captura con los diferentes filtros de emisión para cada fluoróforo.

10. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS:

Los datos de la citometría obtenidos por el Citómetro de Flujo BD[®] FACSCalibur[®] (BD Biosciences, San José, CA, EEUU) fueron capturados y procesados en el software BD CellQuest[®] Pro (versión 5.1 o superior) para Mac[®] OS9. Se utilizó el control negativo, con células sin incubación de anticuerpos, para calibrar el instrumento. Se empleó la emisión de excitación de 488nm para la detección de emisión de FITC (filtro 530/30), de PE (filtro 585/42) y PerCP (filtro 670/LP). Se usó la emisión de excitación de 635nm para la detección de emisión de APC (filtro 661/16). Para el control positivo del Ac Anti-CD45(PerCP) se utilizaron células blancas de sangre periférica separadas por centrifugación y se empleó la emisión de excitación de 488nm para la detección de emisión PerCP (filtro 670/LP).

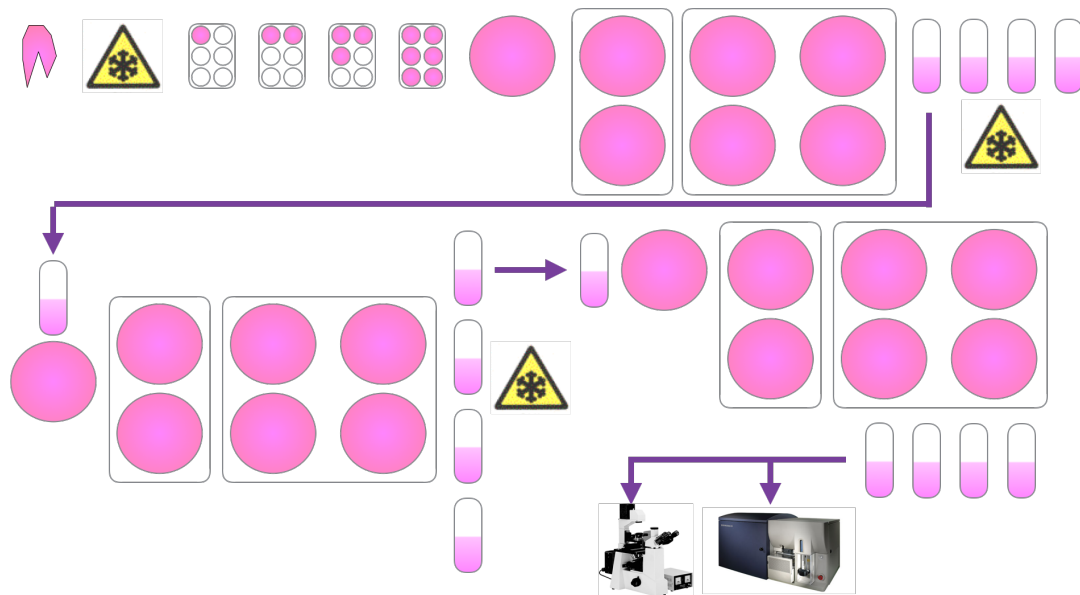
Los datos fueron analizados en el propio software BD CellQuest[®] Pro (versión 5.1 o superior) para Mac[®] OS9 y se crearon los gráficos de puntos (Dot-Plot) que muestran la distribución de las emisiones de los marcadores fluorescentes de los Paneles A y B con sus respectivas frecuencias relativas. También se generaron los histogramas de intensidad fluorescente de cada marcador.

Al realizarse la medición en 3 ocasiones diferentes y para verificar la correlación entre los porcentajes obtenidos de MSCs y CD271(+) se empleó la prueba estadística de coeficiente de correlación lineal de Pearson. El nivel de significancia estadística fue del 5%.

En la Microscopía de Inmunofluorescencia Directa para la determinación del patrón de distribución de la inmunomarcación se utilizó como instrumento el Microscopio de Fluorescencia de cuerpo invertido motorizado Olympus[®] modelo IX81 (Olympus Corporation, Tokio, Japón). La captura y procesamiento de las imágenes se realizó mediante la interfaz Excellence Pro para Mac[®] OS9. Se utilizaron los controles negativos para establecer y filtrar cualquier fluorescencia natural de las células que pudiera

confundirse con señal. Se empleó la emisión de excitación de 488nm para la detección de emisión de FITC (filtro 530/30), de PE (filtro 585/42) y PerCP (filtro 670/LP). Se usó la emisión de excitación de 635nm para la detección de emisión de APC (filtro 661/16). La captura se realizó de los mismos sectores con los diferentes excitadores y filtros para obtener las imágenes de la fluorescencia de los diferentes fluoróforos. El software permite combinar las imágenes en una sola.

La prueba de microscopía de fluorescencia se realizó en sólo una ocasión pero en triplicado para cada panel de inmunofluorescencia (A y B).



Esquema del procedimiento del Estudio. Las células pasaron por alrededor de 13 pasajes de cultivo y 3 etapas de suspensión criogénica desde el tejido original.

V. RESULTADOS

V.1 Caracterización poblacional de los inmunomarcadores en las células de estudio:

En tres mediciones con el citómetro de flujo en momentos diferentes de tres cultivos distintos, pero de la misma muestra poblacional inicial de células, los porcentajes de marcación fluorescente que caracteriza el inmunofenotipo de MSC CD105(+)/CD90(+)/CD45(-)(9) y la positividad para la proteína CD271 se muestran en la siguiente tabla:

Fecha	% MSC	% CD271 +
7 Agosto 2015	93,5	92,1
24 Julio 2015	91,6	89,8
19 Junio 2015	89,9	81,3
Promedio:	91,7	87,7

Tabla 1: Porcentajes de inmunomarcación fluorescente para inmunofenotipo de MSCs CD105(+)/CD90(+)/CD45(-) y CD271(+) de la muestra total en estudio.

Los porcentajes en las tres mediciones de ambos grupos fueron similares. Se aplicó el coeficiente de correlación lineal de Pearson para establecer el grado de correlación de los datos entre MSC+ y CD271+. El test dio un valor cercano a +1 (0,938646677), lo que indica que las variables se correlacionan en forma directa, pero este resultado no presentó significancia estadística (p-value=0,22).

Como se puede apreciar en la propia **Tabla 1**, después de realizar 3 mediciones en ocasiones diferentes, la población de células con inmunofenotipo característico de MSC alcanza en promedio un 91,7% respecto del total de las células de la muestra. Las células CD271(+) corresponden a un 87,7% de ese total.

En la **figura 1** se aprecian los gráficos probabilísticos de puntos (Dot-Plot) de las marcaciones fluorescentes del Panel A de inmunotipificación. La co-marcación positiva de los antígenos CD105 y CD90 se observa en más del 91% de la muestra celular estudiada, como se puede apreciar en el **gráfico 1b**. Por otra parte, en el **gráfico 1d** podemos observar que cerca del 90% de las células de la muestra presentan marcación positiva

para el antígeno CD271. A la derecha de los **gráficos 1b** y **1d** aparecen los promedios de las tres mediciones indicadas en la **Tabla 1**.

La ausencia de marcación para CD45 se presenta cercana a un 96% de la muestra como se aprecia en el **gráfico 1c**. El control negativo que se obtuvo con las células que no se incubaron con los anticuerpos conjugados se verifica en el **gráfico 1a**.

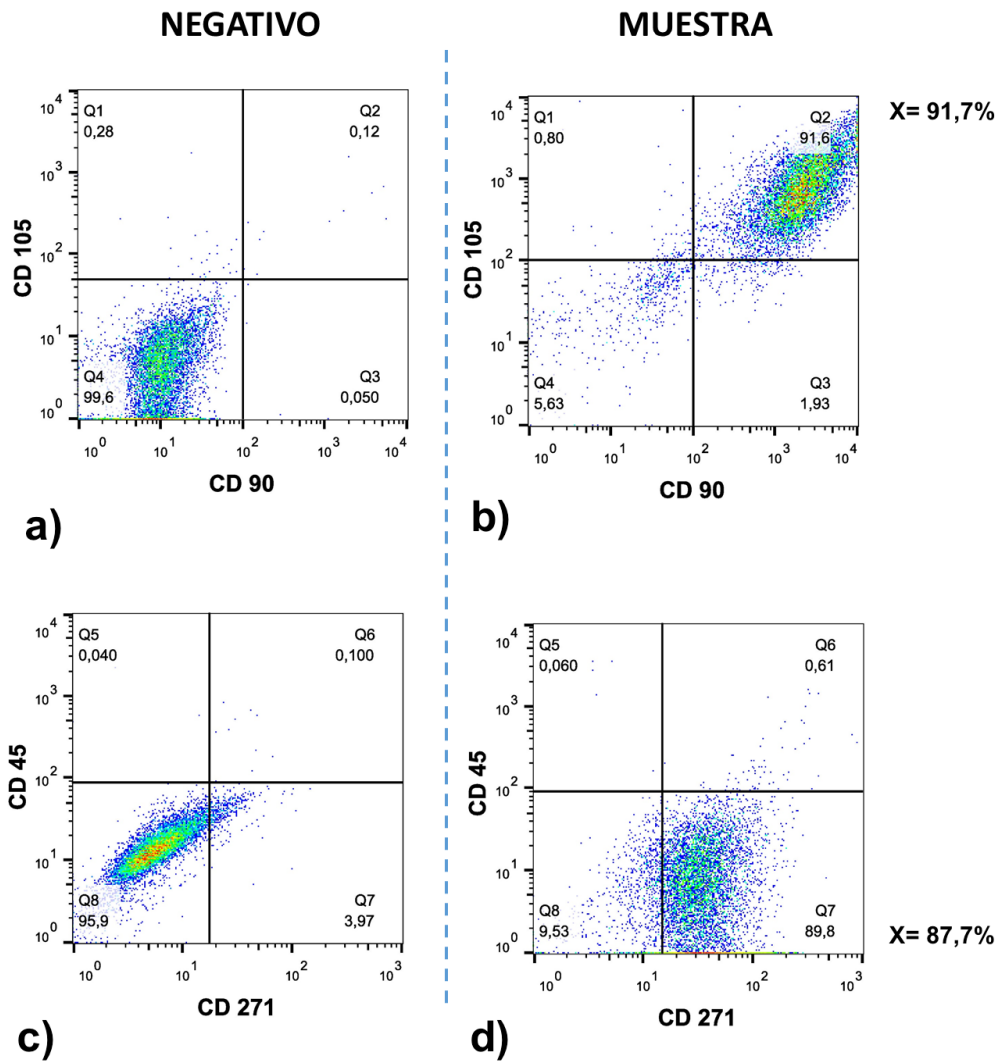


Figura 1. Gráficos probabilísticos de las marcaciones fluorescentes para el **Panel A**. El control negativo es la muestra de células pulpares donde no se incubó el anticuerpo. La densidad poblacional de los cuadrantes se indica en porcentajes. Al lado derecho de los gráficos se muestra el promedio de las tres mediciones.

A continuación, en la **Figura 2** se presentan los Histogramas que muestran las marcaciones fluorescentes de cada uno de los anticuerpos conjugados usados en el Panel A versus el control negativo. La zona negativa de marcación se encuentra en la parte izquierda de los gráficos. Se aprecia claramente la marcación positiva de CD271(FITC), CD90(PE) y CD105(APC) y negativa de CD45(PerCP).

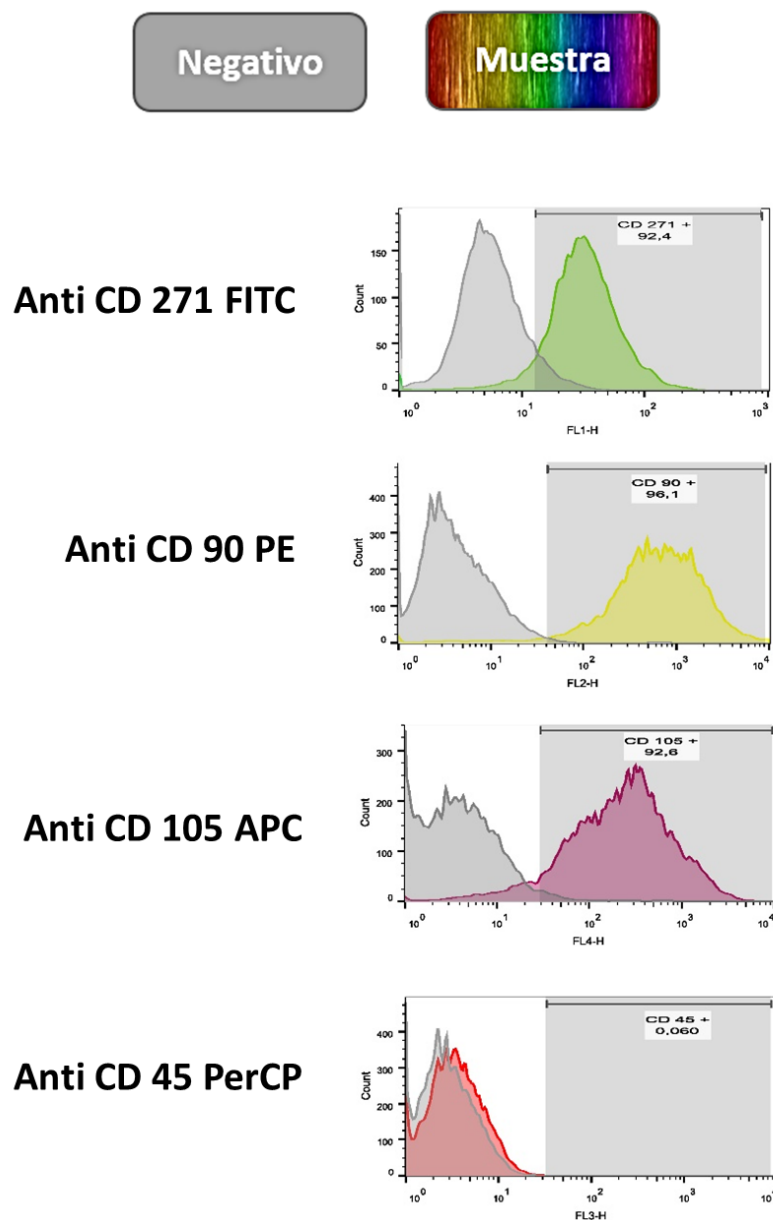


Figura 2. Histogramas de la intensidad fluorescente para todos los marcadores del Panel A usados en células pulpares. El control negativo no fue incubado con anticuerpos.

Para comprobar el funcionamiento del anticuerpo anti-CD45(PerCP) y debido a que en la muestra la marcación era en la práctica negativa, se incubó con células blancas de sangre periférica obtenidas por centrifugación (Ver Anexo 3). Luego se realizó la medición con el citómetro de flujo y se seleccionó por tamaño versus complejidad la población de linfocitos que debería ser positiva. Se obtiene un 65,5% de positividad para el antígeno CD45 (Ver **Figura 3**), comprobando con ello el funcionamiento del anticuerpo anti-CD45 conjugado con PerCP.

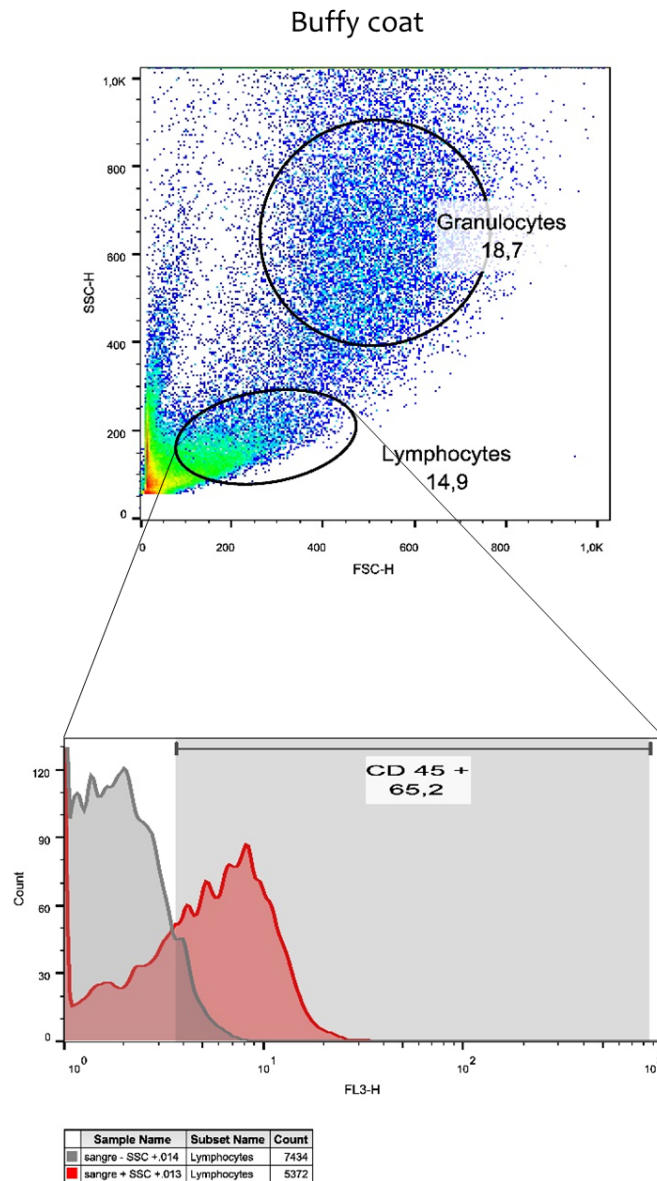


Figura 3. Como control positivo de CD45 se utilizó células blancas de sangre humana, separadas por centrifugación (buffy coat). Mediante tamaño vs complejidad se seleccionó la población de linfocitos, la cual posee marcación positiva para CD45.

V.2 Porcentaje de células pulpares con inmunofenotipo de MSC que presentan el antígeno CD271:

Al analizar las células que presentaban co-marcación positiva de CD105 y CD90, se aprecia que alrededor de un 91% de ellas presentan a su vez marcación positiva para CD271 (Ver **figura 4**).

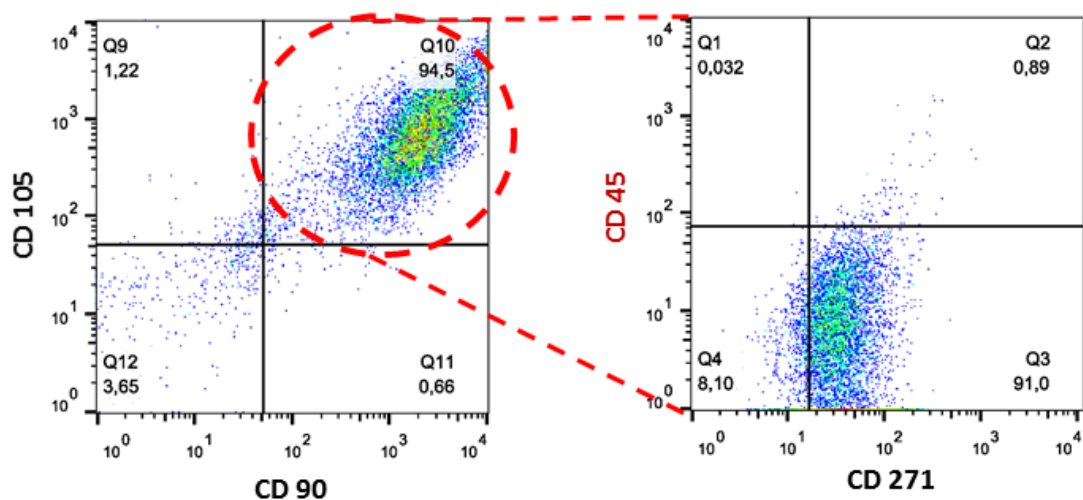


Figura 4. El gráfico muestra que alrededor del 91% de las células con inmunofenotipo de MSC (CD105+CD90+) presentan marcación para CD271.

V.3 Co-expresión y distribución de la inmunomarcación de los diferentes antígenos en estudio.

Los resultados de microscopía de inmunofluorescencia directa se corresponde con los resultados de la citometría, mostrando co-expresión de los marcadores de MSC (CD105/CD90 o CD73) con CD271 y negatividad para CD45. La expresión es de membrana para todos los marcadores positivos, más difusa en CD105, CD90 y CD73 y más relacionada al núcleo en CD271. Las marcaciones se presentan en las mismas células (Ver **Figura 5**).

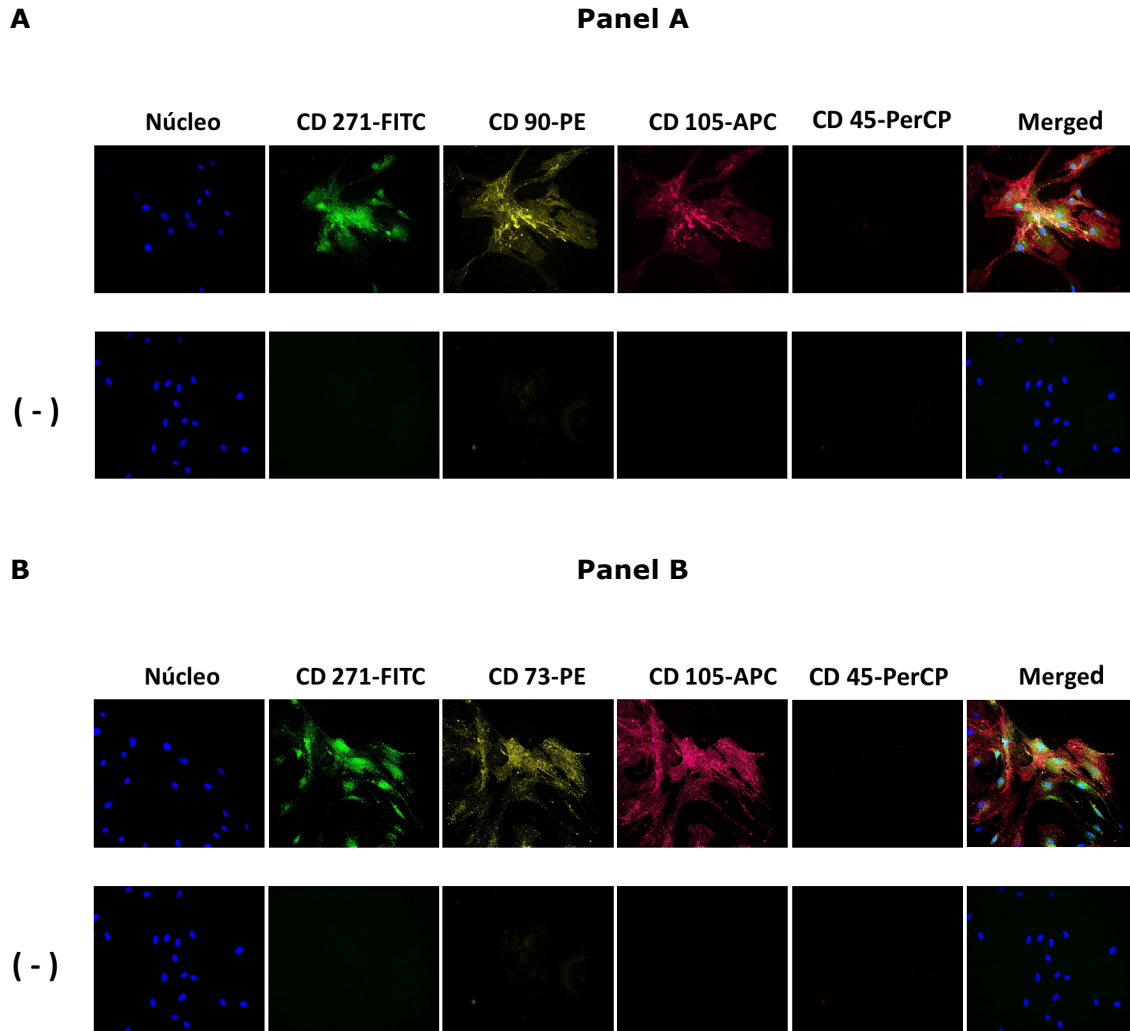


Figura 5. (A) y (B) En las imágenes se puede observar la co-marcación positiva para CD271, CD90/CD73 y CD105 y negativa para CD45. El control negativo sólo posee la marcación nuclear con Hoescht[®]. (Imágenes amplificadas en Anexo 5)

Adicionalmente al estudio, se realizó inmunofluorescencia directa con el anticuerpo anti-CD271(FITC) sobre tejido pulpar que se obtuvo de las muestras congeladas en nitrógeno líquido, como control positivo y con el fin de apreciar la expresión de dicho antígeno *in situ*. La distribución fue bastante homogénea en la pulpa de tercer molar como se puede apreciar en la **figura 6**. Como se indicó antes en el Marco Teórico, la celularidad es bastante mayor en dientes jóvenes (terceros molares son los últimos dientes en formarse) y se va organizando a la distribución característica del tejido pulpar a medida que los dientes entran en función masticatoria y “envejecen”.

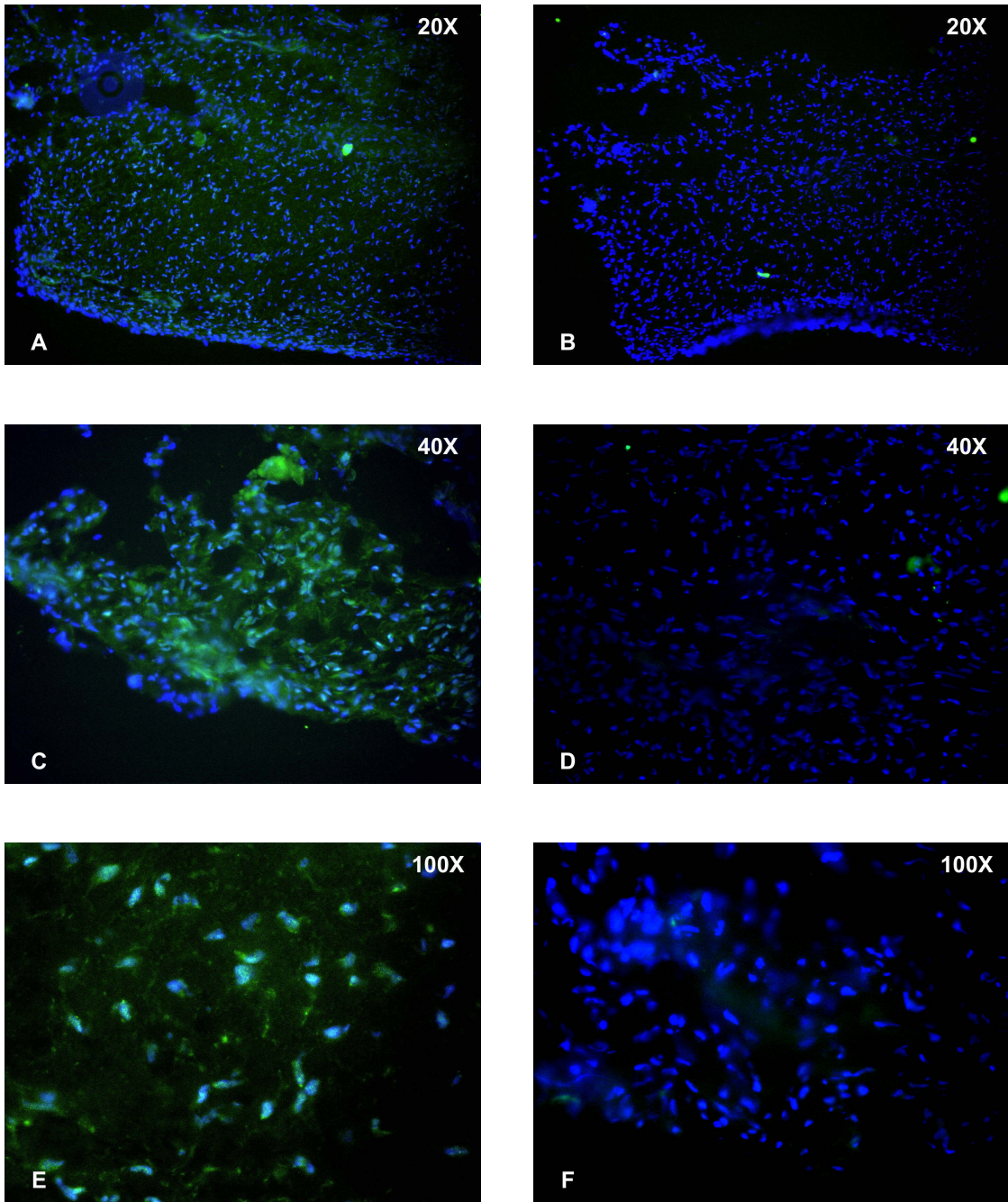


Figura 6. (A),(C)y(E) Muestran la expresión de CD271 in situ en tejido pulpar a diferentes aumentos.(B),(D)y(F) Son los controles negativos y sólo muestran la tinción nuclear con Hoescht®.

VI. DISCUSIÓN

Nuestro estudio persigue, en definitiva, ver la factibilidad de utilizar un único marcador, el CD271, para la identificación de células de pulpa y papila dental con inmunofenotipo de célula madre mesenquimática. Por ello es que quisimos verificar la proporción del cultivo primario de estas células que presentan los marcadores positivos característicos de MSC (CD105/CD90/CD73) con uno de los negativos (CD45) y luego establecer las que presentaban el antígeno CD271.

De la población de células de pulpa y papila dental de tercer molar que pudieron ser cultivadas, el porcentaje de células con inmunofenotipo de MSC que presentaron positividad para CD105 y CD90 y fueron negativas para CD45 alcanzó en promedio un 91,7%. Hay que recordar que esta cifra no está en relación a la población total de células de la pulpa dental in vivo, sino que está en relación a las células pulpares que efectivamente pudieron progresar en condiciones de cultivo convencional y que en los sucesivos pasos mostraron capacidad de adherencia al plástico. Como señalan Dominici et al. (9) y Lv et al.(5), la sola propiedad de adherirse al plástico ya es capaz de seleccionar células con potencialidad de MSC. Creemos que en etapas sucesivas de cultivo, incluyendo episodios de criogenia como señalan Ducret et al. (58), se va generando una selección artificial de las células con capacidades de clonogenicidad propias de MSC. La fracción de células que entra en senescencia o en apoptosis se va perdiendo en los diferentes pasos del cultivo y la fracción celular que conserva esas capacidades de MSC progresa.

Encontramos por su parte, que el 87,7% de la población de células en cultivo poseía el antígeno CD271, lo que parece que va en el sentido que indica la literatura respecto del origen embriológico que poseen estas células, que provienen de las crestas neurales (8, 32, 54). La caracterización de la presencia de éste antígeno en las crestas neurales lo reportaron Wen et al. (31), que analizaron cortes histológicos de procesos faciales embriológicos de ratas Sprague-Dawley que estaban en el día 11,5 del desarrollo. Detectaron con inmunofluorescencia positividad para la expresión de CD271, STRO-1, CD29, CD44, CD90 y CD105. La positividad para CD271 la cifraron en un 60% de las células.

Si bien la significancia estadística que se obtuvo ($p=0,22$) de la prueba de Pearson utilizada para analizar la correlación de las diferentes mediciones entre MSC(+) y

CD271(+) no permite hacer una inferencia válida, se aprecia una tendencia hacia la relación directa. Tanto los porcentajes de MSC(+) como los de CD271(+) se encuentran cercanos al 90%, ello indica que en el peor de los casos, sólo en un 20% de las células no coincidirían los marcadores de MSCs con los del antígeno CD271.

Valores altos de co-expresión como el nuestro reportaron Wen et al. ([31](#)) en la segunda parte de su trabajo cuando realizaron cultivos celulares de los procesos faciales de ratas Sprague-Dawley que estaban estudiando. Al tercer pasaje de cultivo realizaron una citometría y observaron que la positividad para CD271 estaba en un 60% de las células y lo propio ocurría con CD90 (74,5%) y CD105(33,11%). En ese pasaje realizaron un "sorting" de las células CD271(+) usando citómetro de Flujo. En Citometría de Flujo de pasajes posteriores, observaron que aumentó la positividad de CD271(99,69%), ocurriendo algo similar con los marcadores CD90 (97,68%) y CD105 (98,08%).

La alta correlación de células con inmunofenotipo de MSC que presentan el antígeno CD271 concuerda con lo que se observó en la microscopía. En ella podemos observar como los tres marcadores positivos del panel A y del Panel B coinciden en las mismas células. La distribución de la marca de CD105, de CD90 y CD73 coinciden en presentarse con un patrón de membrana característico difuso. CD271 en cambio se presenta un poco menos extendido y se encuentra más concentrado en una zona más perinuclear (Ver Fig. 5 en Resultados).

Existen reportes que las células pulpares CD271(+) presentarían menor proliferación, pérdida gradual de capacidades de célula madre y temprana senescencia y apoptosis a partir del sexto pasaje de cultivo ([30](#), [35](#)). Lo observado en nuestro trabajo es más consistente con lo reportado por Yasui et al. ([59](#)), Ducret et al. ([58](#)) y Waddington et al. ([56](#)) que señalan clonogenicidad notable y capacidad de proliferación de las células CD271(+). Es precisamente por esta capacidad de proliferación que se ha relacionado este antígeno con la tumorigenicidad del cáncer, como lo reportan para el melanoma Redmer et al. ([61](#)), para el osteosarcoma Tian et al. ([62](#)) y para el carcinoma epidermoide Murillo-Sauca et al. ([63](#)).

Respecto del tema de la capacidad de diferenciación que poseen las células CD271 pulpares, podemos comentar que Mikami et al. ([30](#)) reportaron que subpoblaciones de células CD271(+) provenientes de pulpas de dientes deciduos carecen de la capacidad de

diferenciarse a osteoblastos y adipocitos, a diferencia de lo que ocurre con las CD271(-). Por lo cual realizaron una experiencia donde fuerzan a MSCs de la cepa C3H10T1/2, con conocida capacidad de diferenciarse a las tres líneas clásicas, a sobre-expresar el antígeno CD271 lo que hace que estas células pierdan esa capacidad. Así concluyen que el rol del receptor de neurotrofina (p75 o CD271) sería el de inhibir la diferenciación clásica de MSCs. Nuestra observación al respecto es que utilizaron pulpas de dientes deciduos y como queda establecido en el Marco Teórico, se trata de dientes que están al final de su ciclo vital.

Lo anterior, también, se contradice con autores como Wen et al. (31), Abe et al. (8), Yasui et al. (59) y otros que reportan las diferenciaciones clásicas y otras que además incluyen melanocitos y células de estirpe nerviosa. Dai et al. (57) van más allá incluso y señalan que la importancia de las células positivas a p75 (CD271) de origen pulpar respecto de otras subpoblaciones del mismo tejido, es su capacidad de diferenciación a neuronas y de reparación del sistema neural.

Respecto del origen final de las células CD271(+), Martens et al. (55) reportaron detección con inmunohistoquímica de CD271 (NGFRp75) en la zona rica en células subodontoblástica de dientes definitivos. Por otra parte, Abe et al. (8) encuentran expresión de este antígeno en células de la papila dental y no de la pulpa propiamente tal. En nuestro caso, es difícil de precisar, pues se utilizó para el cultivo tanto la pulpa como la papila. Lejos de ser una falta de prolijidad, creemos que en la práctica no tiene sentido hacer esa distinción, pues el provecho que se debe obtener del material biológico para su uso en Medicina Regenerativa debe ser el máximo.

Sin embargo, y a pesar de no ser parte de los objetivos del trabajo, hicimos inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-CD271 sobre tejido pulpar que nos quedaba en crioconservación en nitrógeno líquido (Ver Figura 6 en Resultados). En ella podemos observar la inmunomarcación de CD271 que se obtiene en las células pulpares, que incluso ocupa una zona más amplia y difusa que la señalada por Martens et al. (55). Esto probablemente porque se trata de dientes jóvenes en formación y la estructura característica de la pulpa aún no se encuentra establecida (Ver Fig. 1.2 y 1.4 en Marco Teórico).

Por nuestros hallazgos y atendiendo la presente discusión creemos que las células pulpares y de papila dental CD271(+), que aunque presentan inmunofenotipo de MSC medido con la expresión positiva para los antígenos CD90/CD73/CD105 y negativa para CD45, es posible que sean positivas para CD34 como lo señala el reporte de Pisciotta et al. (35), lo que no se corresponde íntegramente con los criterios inmunofenotípicos de Dominici et al. (9), y por tanto debieran ser más bien catalogadas como Células Madres Derivadas de Crestas Neurales (NCSCs)(8), reconociendo en ellas también una interesante capacidad de diferenciación a una celularidad de estirpe nerviosa (57).

Como sugerencia y para establecer certeza en estos puntos, proponemos una continuación en la investigación con las mismas células y medir con citometría de flujo la presencia de CD271/CD90/CD105 y CD34, estudiar su clonogenicidad en múltiples pasos de cultivo convencional y verificar sus capacidades de diferenciación clásicas y nerviosas en medios ad-hoc para ello.

VII. CONCLUSIONES

Al finalizar nuestro trabajo de Tesis, podemos concluir que las células de pulpa y papila dental de terceros molares en cultivo y que presentan inmunofenotipo de MSC, con manifestación positiva de los antígenos CD105 y CD90/73 y negativa para CD45, alcanza a un 91,7% del total. De ellas, un 91% presenta el antígeno CD271.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem cells international*. 2013;2013:130763.
2. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem cells international*. 2012;2012:342968.
3. Hong HS, Kim YH, Son Y. Perspectives on mesenchymal stem cells: tissue repair, immune modulation, and tumor homing. *Archives of pharmacal research*. 2012;35(2):201-11.
4. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell transplantation*. 2010;19(6):667-79.
5. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2014;32(6):1408-19.
6. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *Journal of endodontics*. 2010;36(9):1504-15.
7. Paino F, Ricci G, De Rosa A, D'Aquino R, Laino L, Pirozzi G, et al. Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. *Eur Cell Mater*.20:295-305.
8. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell biology international*. 2012;36(10):927-36.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
10. Xiao L, Tsutsui T. Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: stem cells in the core. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(11):2624-36.
11. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(12):7544-56.
12. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*. 2008;34(2):166-71.

13. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, et al. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* 2008;17(6):1175-84.
14. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod.* 2010;36(3):469-74.
15. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 2010;5(4):617-31.
16. Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol.* 2010;81(8):1207-15.
17. Jarocha D, Lukasiewicz E, Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society.* 2008;46(3):307-14.
18. Lin W, Tang XM, Kong Y, Wang H, Liu KY. [Comparison between CD271 and CD133 used for immunomagnetic positive sorting enriching in mesenchymal stem cells from bone marrow]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology.* 2008;16(2):333-8.
19. Poloni A, Maurizi G, Rosini V, Mondini E, Mancini S, Discepoli G, et al. Selection of CD271(+) cells and human AB serum allows a large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytotherapy.* 2009;11(2):153-62.
20. Zhou J, Zhu B, Du HY, Sun TS, Zhang CH, Yang LG. [Detection and analysis of CD271, CD133 and CD34 expressions in bone marrow cells by flow cytometry with three color fluorescence labelling]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology.* 2009;17(1):133-6.
21. Aoyagi K, Yamazaki Y, Matsuo A, Shimakura Y, Takeda A, Uchinuma E. Significance of CD271 in bone marrow mesenchymal stem cells--changes by cryopreservation. *The Journal of craniofacial surgery.* 2010;21(3):666-78.
22. Flores-Torales E, Orozco-Barocio A, Gonzalez-Ramella OR, Carrasco-Yalan A, Gazarian K, Cuneo-Pareto S. The CD271 expression could be alone for establisher phenotypic marker in Bone Marrow derived mesenchymal stem cells. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society.* 2010;48(4):682-6.
23. Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Gimeno-Longas MJ, Muinos-Lopez E, Diaz-Prado S, de Toro FJ, et al. Bone marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen promote in vitro the repair of articular cartilage defects. *Tissue engineering Part A.* 2011;17(7-8):1169-79.

24. Kuci S, Kuci Z, Kreyenberg H, Deak E, Putsch K, Huenecke S, et al. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica*. 2010;95(4):651-9.
25. Kuci Z, Kuci S, Zircher S, Koller S, Schubert R, Bonig H, et al. Mesenchymal stromal cells derived from CD271(+) bone marrow mononuclear cells exert potent allosuppressive properties. *Cytotherapy*. 2011;13(10):1193-204.
26. Cox G, Boxall SA, Giannoudis PV, Buckley CT, Roshdy T, Churchman SM, et al. High abundance of CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) in intramedullary cavities of long bones. *Bone*. 2012;50(2):510-7.
27. Liu QH, Ge J, Liu KY. [Are CD133 and CD271 useful in positive selection to enrich umbilical cord blood mesenchymal stem cells?]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology*. 2010;18(5):1286-91.
28. Attar A, Ghalyanchi Langeroudi A, Vassaghi A, Ahrari I, Maharlooeei MK, Monabati A. Role of CD271 enrichment in the isolation of mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Cell biology international*. 2013;37(9):1010-5.
29. Xiao J, Yang X, Jing W, Guo W, Sun Q, Lin Y, et al. Adipogenic and osteogenic differentiation of Lin(-)CD271(+)Sca-1(+) adipose-derived stem cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;377(1-2):107-19.
30. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, et al. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem cells and development*. 2011;20(5):901-13.
31. Wen X, Liu L, Deng M, Zhang L, Liu R, Xing Y, et al. Characterization of p75(+) ectomesenchymal stem cells from rat embryonic facial process tissue. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;427(1):5-10.
32. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología y embriología bucodental*. 2 ed ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004. XV, 467 p. p.
33. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A, Sánchez Quevedo MdC, Carda Batalla MdC, Carranza M. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental : [bases estructurales de la patología, el diagnóstico, la terapéutica y la prevención odontológica]*. 3 ed. Buenos Aires ; Madrid etc: Editorial Médica Panamericana; 2009. VIII, 454 p. p.
34. Neville BW. *Oral and maxillofacial pathology*. 3rd ed ed. St. Louis: Saunders/Elsevier; 2009. XVI, 968 p. p.
35. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, et al. Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC developmental biology*. 2015;15(1):14.

36. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod.* 2012;36(9):1504-15.
37. Zheng YB, Gao ZL, Xie C, Zhu HP, Peng L, Chen JH, et al. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. *Cell Biol Int.* 2008;32(11):1439-48.
38. Dreger T, Watson JT, Akers W, Molligan J, Achilefu S, Schon LC, et al. Intravenous application of CD271-selected mesenchymal stem cells during fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma.* 2014;28 Suppl 1:S15-9.
39. Xiao Y, Wang Y, Li L, Li YH, Pang Y, Song JY, et al. Homing of chloromethylbenzoyl ammonia-labeled bone marrow mesenchymal stem cells in an immune-mediated bone marrow failure mouse model in vivo. *Genetics and molecular research : GMR.* 2014;13(1):11-21.
40. Nampo T, Watahiki J, Enomoto A, Taguchi T, Ono M, Nakano H, et al. A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. *Journal of periodontology.* 2010;81(9):1264-72.
41. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 7):1161-6.
42. Lv F, Lu M, Cheung KM, Leung VY, Zhou G. Intrinsic properties of mesenchymal stem cells from human bone marrow, umbilical cord and umbilical cord blood comparing the different sources of MSC. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012;7(6):389-99.
43. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood.* 2004;103(9):3313-9.
44. Psaltis PJ, Paton S, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, et al. Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *Journal of cellular physiology.* 2010;223(2):530-40.
45. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental hematology.* 2008;36(8):1035-46.
46. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-36.
47. Pierdomenico Ruggeri ARF, Lucia Cappabianca,, Natalia Di Ianni MR, Stefania Merolle, Alberto Gulino, Mackay aAR. Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Involvement in Human Neuroblastoma. 2013.

48. Watson JT, Foo T, Wu J, Moed BR, Thorpe M, Schon L, et al. CD271 as a marker for mesenchymal stem cells in bone marrow versus umbilical cord blood. *Cells, tissues, organs*. 2013;197(6):496-504.
49. Mifune Y, Matsumoto T, Murasawa S, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, et al. Therapeutic superiority for cartilage repair by CD271-positive marrow stromal cell transplantation. *Cell transplantation*. 2013;22(7):1201-11.
50. Kuci Z, Seiberth J, Latifi-Pupovci H, Wehner S, Stein S, Grez M, et al. Clonal analysis of multipotent stromal cells derived from CD271+ bone marrow mononuclear cells: functional heterogeneity and different mechanisms of allosuppression. *Haematologica*. 2013;98(10):1609-16.
51. Jones E, English A, Churchman SM, Kouroupis D, Boxall SA, Kinsey S, et al. Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(7):1944-54.
52. Demas M, Agnew N, Fan J, Maekawa S, Wong L, Xudong W, et al. Strategies for sustainable tourism at the Mogao Grottoes of Dunhuang, China. 1 online resource p.
53. Chan AA, Hertszenberg AJ, Funderburgh ML, Mann MM, Du Y, Davoli KA, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into cells with corneal keratocyte phenotype. *PLoS One*. 2013;8(2):e56831.
54. Al-Zer H, Apel C, Heiland M, Friedrich RE, Jung O, Kroeger N, et al. Enrichment and Schwann Cell Differentiation of Neural Crest-derived Dental Pulp Stem Cells. *In vivo*. 2015;29(3):319-26.
55. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrichts I. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells, tissues, organs*. 2012;196(6):490-500.
56. Waddington RJ, Youde SJ, Lee CP, Sloan AJ. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells, tissues, organs*. 2009;189(1-4):268-74.
57. Dai JW, Yuan H, Shen SY, Lu JT, Zhu XF, Yang T, et al. p75 neurotrophin receptor positive dental pulp stem cells: new hope for patients with neurodegenerative disease and neural injury. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2013;22(4):469-72.
58. Ducret M, Fabre H, Farges JC, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *Journal of endodontics*. 2015;41(9):1492-9.
59. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, et al. Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. *J Dent Res*. 2015.
60. Xiao L, Tsutsui T. Three-dimensional epithelial and mesenchymal cell co-cultures form early tooth epithelium invagination-like structures: expression patterns of relevant molecules. *J Cell Biochem*. 2012;113(6):1875-85.

61. Redmer T, Welte Y, Behrens D, Fichtner I, Przybilla D, Wruck W, et al. The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PloS one*. 2014;9(5):e92596.
62. Tian J, Li X, Si M, Liu T, Li J. CD271+ osteosarcoma cells display stem-like properties. *PloS one*. 2014;9(6):e98549.
63. Murillo-Sauca O, Chung MK, Shin JH, Karamboulas C, Kwok S, Jung YH, et al. CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014.

ANEXO 1

APROBACIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA - CONSENTIMIENTO INFORMADO

El Proyecto del Estudio y Consentimiento Informado para Donación de Órganos Dentarios fue presentado para aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Odontología el 23 de Mayo de 2013 (Ver Página), que en ese entonces se encontraba constituido por la Prof. Dra. Marie Therese Flores, Presidenta del Comité y por los académicos Prof. Dra. Marjorie Borgeat, secretaria y el Prof. Dr. Rodrigo Fuentes.

El Proyecto "Estudio In Vitro del Efecto de la Matriz Extracelular de Amnios Humano en la Diferenciación de Células Madres de la Pulpa Dental Humana", implicaba la donación de órganos dentarios humanos (terceros molares que tuviesen indicación odontológica de extracción) de pacientes jóvenes sanos para la obtención de las Células Madre pulpares.

El Comité, da su aprobación al Proyecto y Consentimiento Informado el 04 de Julio de 2013 (Ver Página 56). Se procede a solicitar los permisos y ayudas clínicas correspondientes al Sr. Decano de la Facultad de Odontología y al Sr. Director de Servicios Clínicos de la Facultad de Odontología. En Octubre de 2013, 02 pacientes voluntarios firman el consentimiento informado (ver Formulario en Páginas 57 a 61) y se procede a realizar la toma de muestras y el congelamiento de las pulpas dentales.

Durante 2014, mientras se realizaban los ensayos de cultivo y amplificación celular, se decide con los tutores de tesis que el estudio debe considerar en primera instancia la identificación inmunofenotípica de las células pulpares en cultivo, para lo cual se proyecta como Tesis de Grado de Magíster el presente estudio y posteriormente avanzar en el tema de los efectos de la matriz extracelular de amnios en estas células.

Ricardo Alberto Moreno Silva

Tesista

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA
CÁTEDRA DE PATOLOGÍA Y
DIAGNÓSTICO ORAL**

Valparaíso, 23 de Mayo de 2013.

SRA.
PROF. DRA. MARIE THERESE FLORES B.
PRESIDENTE COMITE
DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
PRESENTE:

Estimada Profesora:

Por medio de la presente solicito al Comité que Ud preside someter a revisión para su aprobación a mi Proyecto de Tesis y Consentimiento Informado asociado, requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas con mención en Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad.

Agradeciendo desde ya su gestión, atentamente,

Prof. Dr. Ricardo Moreno Silva
Profesor Adjunto
Cátedra de Patología y Diagnóstico Oral
Facultad de Odontología
Tesisista de Programa de Magíster
Ciencias Biomédicas con Mención en
Biología Celular y Molecular
Facultad de Medicina

CERTIFICADO

El proyecto de investigación "Estudio in vitro del efecto de la matriz extracelular de amnios humanos en la diferenciación de células madres de la pulpa dental humana" cuyo investigador responsable es Dr. Ricardo Moreno Silva, alumno del programa de Magister en Ciencias Biomédicas con mención en Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, fue presentado al Comité de Bioética de la Investigación de la Facultad de Odontología, constituido por Marjorie Borgeat, Cirujano- Dentista, académico, Marie Therese Flores, Cirujano-Dentista, académico y Rodrigo Fuentes, Cirujano-Dentista, académico.

Quien suscribe sostuvo una entrevista con el investigador responsable, confirmando que éste estudio no cae dentro del ámbito de una investigación biomédica, al tratarse de un estudio in vitro, por lo que no corresponde someterla a análisis por parte del comité. Sin embargo, se evaluó el formulario de consentimiento informado para la donación de muestras biológicas, en este caso dientes permanentes, no existiendo observaciones.

Firma el Certificado en representación del Comité


Dra. Marjorie Borgeat M

Secretaria

Valparaíso, 4 de julio de 2013

MBM/mbm.

Consentimiento Informado para participantes de investigación

Título de la investigación: "Estudio in vitro del efecto de la matriz extra celular de amnios humano en la diferenciación de células madre de la pulpa dental humana"

Ley N° 20.120: Nuestra investigación se encuentra dentro del marco regulatorio que brinda el Reglamento Actualizado de la Ley N° 20.120 que trata sobre "Investigación científica en el ser humano, su genoma y prohíbe la clonación humana" en especial a lo que se refiere a los artículos 6º, 8º, 10º, 11º, 12º, 13º, 24º, 25º y 26º.

Definiciones según Artículo 8º de Reglamento de Ley N° 20.120:

Patrocinador: Departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Investigadores Responsables: La presente investigación es conducida por Ricardo Moreno Silva, de profesión Cirujano-Dentista y tesista del Programa de Magíster en Ciencias Biomédicas con Mención en Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Su tutor de Tesis es el Dr. Sebastián San Martín y co-tutor el Dr. Joan Villena, ambos docentes de dicho programa.

Investigador Principal: Ricardo Moreno Silva

Establecimiento o sitio de investigación:

Etapas 1: Obtención de Muestras: Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso.

Etapas 2: Obtención y cultivo de Células Madre: Centro de Investigaciones Biomédicas. Edificio Bruno Günther, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Director del Establecimiento:

Etapas 1: Prof. Dr. Gastón Zamora Álvarez, Decano de Facultad de Odontología.

Etapas 2: Prof. Dr. Sebastián San Martín. Director de Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina.

El propósito de esta ficha de consentimiento es ayudarle a tomar la decisión de participar en una investigación biomédica como donante de órganos dentarios.

Objetivo de la investigación: El propósito de nuestra investigación es obtener, aislar y cultivar células madres provenientes de la pulpa dental de terceros molares sanos de donantes varones. Una vez que podamos cultivar dichas células nuestro objetivo será "Determinar los efectos sobre la proliferación, la viabilidad y la diferenciación celular que

produce a células madre de pulpa dental humana cuando se co-cultivan con amnios humano descelularizado”.

Se utilizarán células madres de pulpa dental porque ellas provienen directamente de un evento relativamente temprano en el desarrollo embriológico humano y que es la formación de las crestas neurales. Sus vías de diferenciación incluyen osteoblastos, fibroblastos, condroblastos, adipoblastos, odontoblastos, mioblastos, neuronas y células de soporte nervioso como células de Schwann y Satélites, así como células pigmentarias, los melanocitos.

Participación en la investigación: Su participación es voluntaria, libre y soberana. Consiste en que Ud. nos done sus terceros molares con indicación de extracción, para que podamos retirar de ellos las Células Madre (Stem Cells) necesarias para nuestra investigación.

Luego de la extracción dental, los dientes se transportarán en un medio especial al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina, donde mediante seccionamiento se procederá a retirar el tejido pulpar el que será criopreservado hasta su utilización final. Los restos dentarios se descartarán siguiendo los protocolos de eliminación de material orgánico sólido.

Luego, mediante fraccionamiento y digestión enzimática se obtendrán las células madres necesarias para el estudio.

No se realizarán pruebas genéticas de ninguna especie ni se realizará individualización de sus muestras para ningún fin fuera de esta investigación.

Al finalizar esta investigación los tejidos donados serán eliminados salvo indicación explícita del donante para que sus tejidos se mantengan en criopreservación para futuras investigaciones y/o uso personal.

El donante es libre de retirar sus muestras de tejido en cualquier momento que lo estime conveniente. Sólo debe hacer llegar su voluntad por escrito al investigador principal.

Criterios de inclusión: Son aptos para participar varones sanos, de 18 a 25 años, estudiantes de la Carrera de Odontología de la Universidad de Valparaíso, que tengan sus terceros molares sanos erupcionados, en semi-erupción, en semi-inclusión o incluidos, cuya indicación sea la extracción por falta de espacio en la arcada dental.

Riesgos: Sólo la obtención de los dientes donados supone algún riesgo para Ud . y son los propios del acto quirúrgico de extracción de terceros molares, que en general son comunes a cualquier cirugía: dolor, hinchazón, infección o sangramiento. Dichos riesgos son manejados previa y posteriormente por el equipo quirúrgico ya sea por medidas de carácter local o sistémico y farmacológico. **Por ello es que los participantes deben estar sanos al momento de la cirugía y sus terceros molares deben tener una**

indicación clara de extracción por falta de espacio. No se aceptará donaciones de personas que no cumplan ese requisito.

El equipo quirúrgico incluirá a docentes y residentes del Programa de Especialización en Cirugía Oral y Máxilofacial de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Beneficios: La investigación no supone beneficios directos a los participantes, salvo los relacionados con la extracción sin costo de los terceros molares que no poseen espacio en la arcada dental.

Costos: Los costos asociados al diagnóstico clínico e imagenológico, de la cirugía y sus cuidados farmacológicos serán asumidos por el investigador responsable en acuerdo con lo que indique el Decano de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso

Compensaciones: Este estudio no contempla compensación económica para Usted. Sin embargo y además de nuestra gratitud, Ud. tendrá la satisfacción de haber colaborado en el inicio de una línea de investigación que sin duda será importante para el desarrollo científico de nuestra Facultad.

Confidencialidad de la información: La información personal que se recoja será confidencial y sólo se utilizará para la individualización de las muestras en esta investigación. La custodia de los datos corresponderá al investigador principal y éstos serán destruidos una vez terminada la Tesis.

Voluntariedad: La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento, y por tanto retirarse de esta investigación, en el momento que estime conveniente. Sólo debe manifestar su voluntad por escrito al Investigador Principal.

Preguntas: Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Para solucionar cualquier duda debe comunicarse con el encargado de este proyecto: Dr. Ricardo Moreno Silva, mail: ricardo.moreno@uv.cl , teléfono: 98990199, o la secretaria del Comité de Bioética: Dra. Marjorie Borgeat, mail: cbi.odo.uv@gmail.com .

Este Proyecto y Consentimiento Informado se somete a la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Dr. Ricardo Moreno Silva
Rut: 10.070.959-7

VALPARAÍSO, Mayo de 2013.

**FICHA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
ESTUDIO DE INVESTIGACION:**

**“ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO DE LA MATRIZ EXTRA CELULAR DE AMNIOS
HUMANO EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL
HUMANA”**

Valparaíso,

Yo,
C.I....., fecha de nacimiento....., declaro haber leído previamente el documento de consentimiento informado y haber sido informado(a) por el Dr. Ricardo Moreno Silva acerca del mismo.

Entiendo que el estudio se enmarca dentro de las exigencias del Reglamento de la Ley 20.120 respecto de “Investigación científica en el ser humano, su genoma y prohíbe la clonación humana”

Declaro conocer que este documento presenta una copia para los investigadores responsables y otra para mi archivo personal.

Acepto participar donando mis terceros molares sanos y entiendo que deben tener clara indicación de extracción por falta de espacio en mis maxilares. Se que de ellos se obtendrán las células madre (Stem Cells) necesarias para el estudio.

Conozco que el objetivo del estudio es determinar los efectos que provoca la matriz extracelular de amnios humano sobre una población de células madre obtenidas de la pulpa dental.

Se me informó que las células obtenidas sólo serán utilizadas para esta investigación y no se realizarán pruebas genéticas de ninguna especie en ellas. También se me informó que las muestras obtenidas serán destruidas una vez finalizada la investigación, salvo que yo decida mantenerlas en criopreservación para futuras investigaciones o usos personales.

Entiendo que no recibiré compensación económica directa por donar mis terceros molares, salvo el de recibir el beneficio de que se me extraerán en forma gratuita dichos dientes que de todas maneras tienen indicación de ser extraídos por falta de espacio.

Entiendo que **No debo pagar** los estudios clínicos e imagenológicos que permiten determinar si estoy dentro de los criterios de inclusión. Se, además, que los gastos respecto de la cirugía y los cuidados posteriores serán asumidos por el investigador principal en acuerdo con el Decano de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Estoy al tanto de que me operará un equipo quirúrgico experimentado en dicha cirugía y que incluye docentes y residentes de la Especialidad de Cirugía Máxilofacial de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Comprendo que la información que entregue en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de la índole científico y será eliminada al finalizar la investigación.

He sido informado(a) de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona.

Para solucionar cualquier duda debo comunicarme con el Dr. Ricardo Moreno Silva, mail: ricardo.moreno@uv.cl , teléfono: 98990199, encargado de este proyecto o con la Dra. Marjorie Borgeat, secretaria del Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, mail: cbi.odo.uv@gmail.com.

Firma del participante

Firma Dr. Ricardo Moreno Silva

ANEXO 2

PROCEDIMIENTO DE INCUBACIÓN DE ANTICUERPOS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

A) En Laboratorio de Cultivo Celular (Dr. Villena):

- 1.- Se retira de estufa de cultivo placa de 100mm con aprox. 3×10^6 células. Se elimina medio cultivo y se lava con PBS 1x (Hyclone[®], USA) por 5min.
- 2.- Se realiza despegue de células del plástico de la placa con 1,5ml de Tripsina/EDTA 0,25% (Hyclone[®], USA). Se deja incubando por 10min en estufa a 37°C con 5%CO₂.
- 3.- Se frena reacción agregando 3,5mL de medio de cultivo (DMEM high glucose/HAM'S/F-12 (Hyclone[®], USA), suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivo (SBF) (Hyclone[®], USA), 100 UI/ml de penicilina G (Hyclone[®], USA) y 100 µg/ml de Estreptomocina/Anfotericina B (Hyclone[®], USA)).
- 4.- Se colectan las células en 1 tubo de 12ml y se centrifuga a 1.500rpm x 5min.

B) En Laboratorio de Histología e Inmunotinción (Dr. San Martin):

- 5.- Se retira sobrenadante y se re-suspende pellet con 2ml de PBS/Tween20 0,3% (Hyclone[®]/Winkler[®]). Se agrega BSA 5% para bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos por 30min a T^o Ambiente.
- 6.- Se centrifuga a 1.500rpm x 5min.
- 7.- Se re-suspende pellet con 240µl de PBS/Tween20 y la solución se divide en 3 tubos Eppendorf de 1,5ml de la siguiente forma:
 - Tubo A: 100µl. No se incubará con anticuerpos y será control negativo.
 - Tubo B: 70µl.
 - Tubo C: 70µl.
- 8.- A los tubos B y C se les agregan 10µl de solución de anticuerpos conjugados anti-CD271, 10µl de Ac anti-CD90, 10µl de Ac anti-CD105 y 10µl de Ac anti-CD45. Tubos B y

C quedan con 110µl y una dilución de Acs de 1/11 como lo indican los Laboratorios Fabricantes.

9.- Los tres tubos se incuban en estufa por 60 min a 37°C.

10.- Cada tubo Eppendorf se completa con PBS/Tween20 hasta 1ml. Se centrifuga a 1.500rpm por 5min.

11.- Se elimina el sobrenadante y los pellets se re-suspenden en 500µl de PBS/Tween20 y soluciones se cambian a tubos para Citometría. Se rotulan A negativo, B y C de estudio.

12.- Tubos se llevan a Citómetro de Flujo para captura de datos.

ANEXO 3

PROCEDIMIENTO DE INCUBACIÓN DE ANTICUERPOS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO DE CONTROL POSITIVO PARA CD45

A) En Laboratorio de Cultivo Celular (Dr. Villena):

- 1.- Se obtienen con jeringa hipodérmica 10ml de sangre periférica (donante es el investigador principal). Se transfiere a tubos de 12ml sin anticoagulante.
- 2.- Se realiza centrifugado para separación de fracción roja de la blanca a 3.000rpm por 10-13min (Técnica según Choukroun et al, 2001). Con pinza se retira fracción de fibrina gelificada y con pipeta el sobrenadante y la zona de la fracción de células blancas.
- 3.- La fracción blanca es colectada en 1 tubo de 12ml y se centrifuga a 1.500rpm x 5min.

B) En Laboratorio de Histología e Inmunotinción (Dr. San Martín):

- 4.- Se retira sobrenadante de suero y se re-suspende pellet con 2ml de PBS/Tween20 0,3% (Hyclone®/Winkler®). Se agrega BSA 5% para bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos por 30min a T° Ambiente.
- 5.- Se centrifuga a 1.500rpm x 5min.
- 6.- Se re-suspende pellet con 210µl de PBS/Tween20 y la solución se divide en 2 tubos Eppendorf de 1,5ml de la siguiente forma:
 - Tubo A: 110µl. No se incubará con anticuerpos y será control negativo.
 - Tubo B: 100µl.
- 7.- Al tubo B se le agrega 10µl de solución de anticuerpos conjugados anti-CD45. Tubo B queda con 110µl y una dilución de Acs de 1/11 como lo indica el Laboratorio Fabricante.
- 8.- Ambos tubos se incuban en estufa por 60 min a 37°C.
- 9.- Cada tubo Eppendorf se completa con PBS/Tween20 hasta 1ml. Se centrifuga a 1.500rpm por 5min.

10.- Se elimina el sobrenadante y los pellets se re-suspenden en 500µl de PBS/Tween20 y soluciones se cambian a tubos para Citometría. Se rotulan A negativo y B de estudio.

12.- Se llevan a Citómetro de Flujo para captura de datos.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

A) En Laboratorio de Cultivo Celular (Dr. Villena):

1.- A cultivo en placa de 100mm, se les agrega 10 discos de vidrios cubreobjetos con el fin de que las células crezcan y se adhieran sobre ellos.

2.- Cuando las células presentan una confluencia de un 60% se retiran los discos, se traspan a placa de 12 pocillos y las células se fijan en paraformaldehído al 4%(diluido en PBS) por 10 min.

B) En Laboratorio de Histología e Inmuntinción (Dr. San Martin):

3.- Se realizan 3 lavados con PBS/Tween20 por 5min.

4.- Se retira el PBS/Tween20 y los cubreobjetos se cubren con Cas-Block® (Invitrogen®) para bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos por 30min a T° ambiente. Los pocillos se sellan con Parafilm® para evitar deshidratación.

5.- Mientras, se rotulan 2 tubos Eppendorf (Panel A y Panel B) y se llenan con 70µl de PBS/Tween20 cada uno. Al tubo Panel A se le agregan 10µl de la solución de cada anticuerpo: anti-CD271, anti-CD90, anti-CD105 y anti-CD45. Al tubo del Panel B se le agregan 10µl de la solución cada anticuerpo: anti-CD271, anti-CD73, anti-CD105 y anti-CD45.

6.- Se realizan 3 lavados con PBS/Tween20 por 5min.

7.- Se retira el PBS/Tween20 de los cubreobjetos y se cubren 3 de ellos con el preparado del Panel A y 3 del Panel B. 2 se cubren sólo con PBS/Tween20. Los pocillos se sellan con Parafilm® para evitar deshidratación.

8.- Se realiza incubación en estufa a 37°C por 1 hora.

9.- Se realizan 3 lavados con PBS/Tween20 por 5min.

10.- Se retira PBS/Tween20 y todos los cubreobjetos (de estudio y negativos) se incuban con colorante nuclear (Hoescht[®]) por 10min a T^o ambiente.

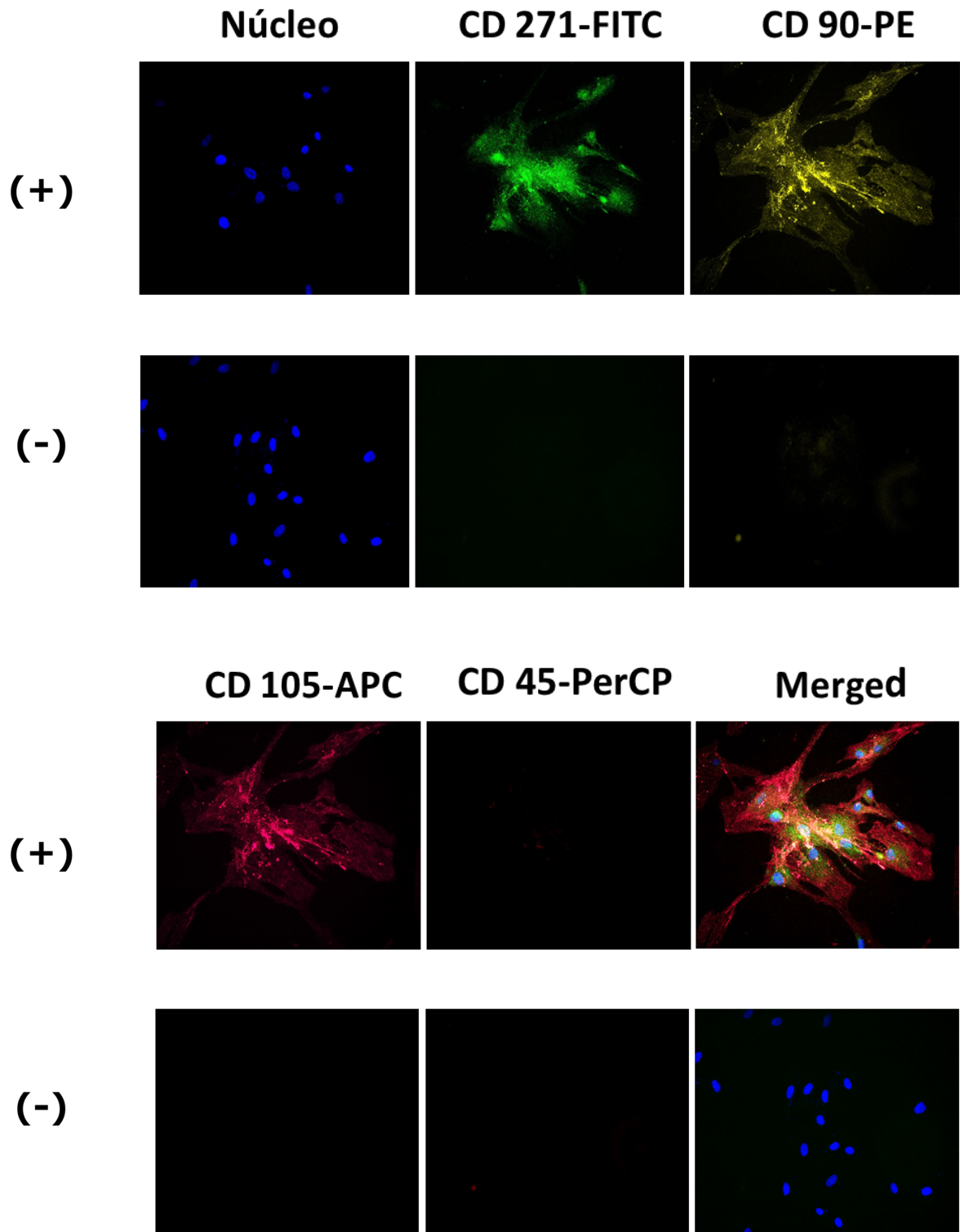
11.- Se realizan 3 lavados con PBS/Tween20 por 5min.

12.- Se realiza montaje acuoso sobre lámina portaobjetos 3 del panel A y uno negativo. En otra lámina portaobjetos 3 del Panel B y uno negativo. Se rotulan debidamente.

13.- Láminas se llevan a observación y captura de imágenes en Microscopio de Fluorescencia.

ANEXO 5

A) PANEL A



B) PANEL B

